

**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario**



**Tesis de Doctorado**

**“ESTUDIOS ENDOMORFOLÓGICOS,  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN  
FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE ESPECIES  
NATIVAS DE LA  
FAMILIA SIMAROUBACEAE”.**

**Licenciada en Biotecnología  
Maria Noel Campagna**

**Rosario, Argentina**

**2014**

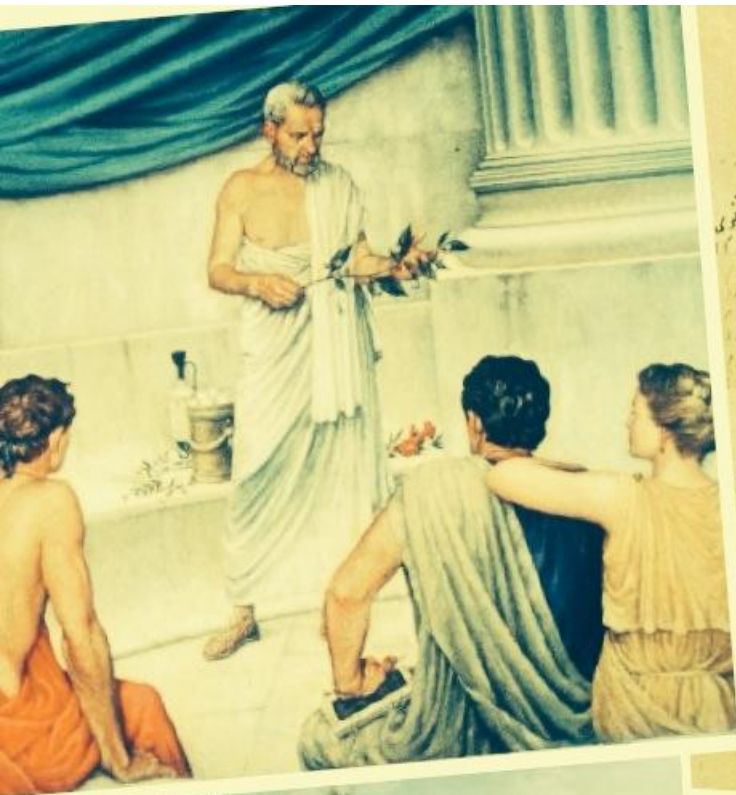
# **“ESTUDIOS ENDOMORFOLÓGICOS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE ESPECIES NATIVAS DE LA FAMILIA SIMAROUBACEAE”.**

**Maria Noel Campagna**

Licenciada en Biotecnología –Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la asignatura Farmacobotánica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, y en el Área de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica dependiente de la Universidad de Buenos Aires durante el período comprendido entre enero del 2009 y diciembre de 2013, bajo la dirección de la **Dra. Martha Ana** Gattuso y la co dirección de la **Dra. Adriana Broussalis**.





## Capítulo I:

# Introducción General

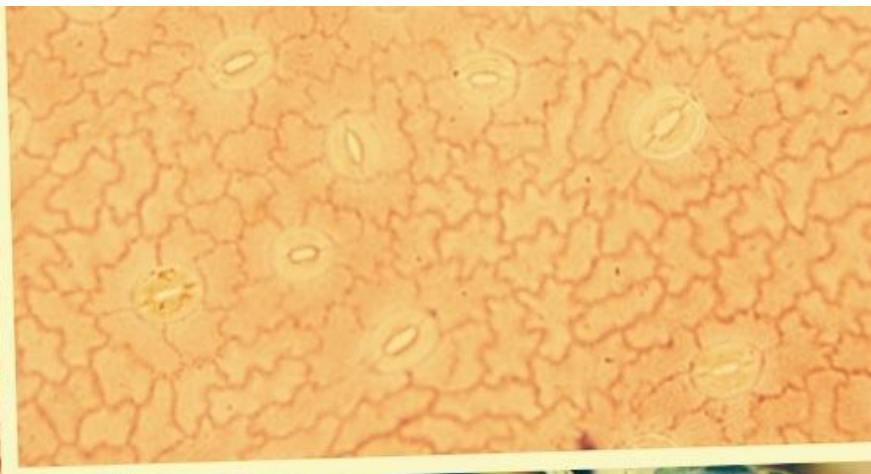




# Capítulo II: Materiales y Métodos

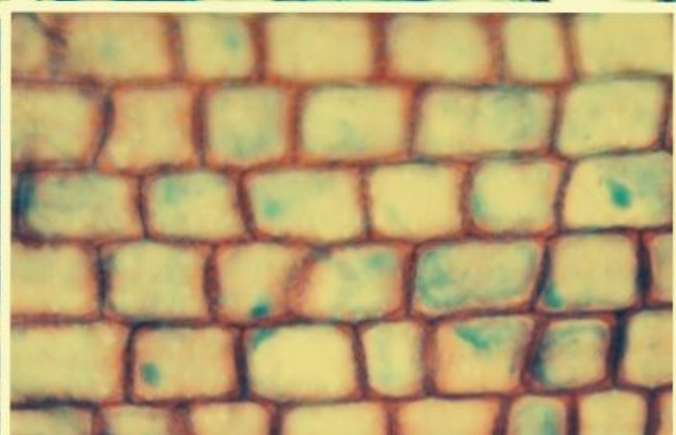
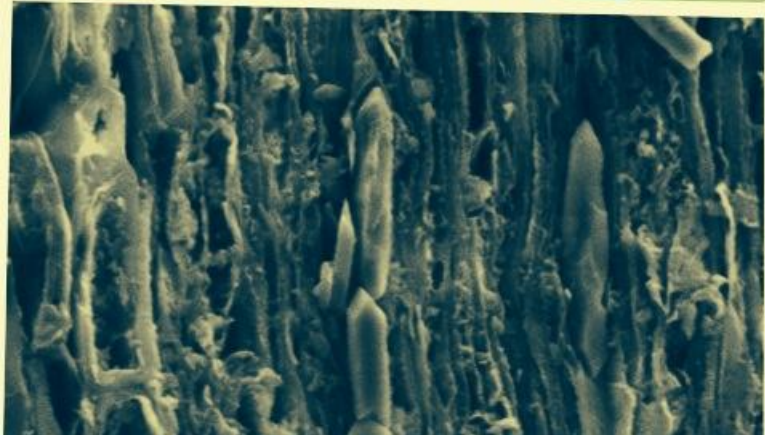




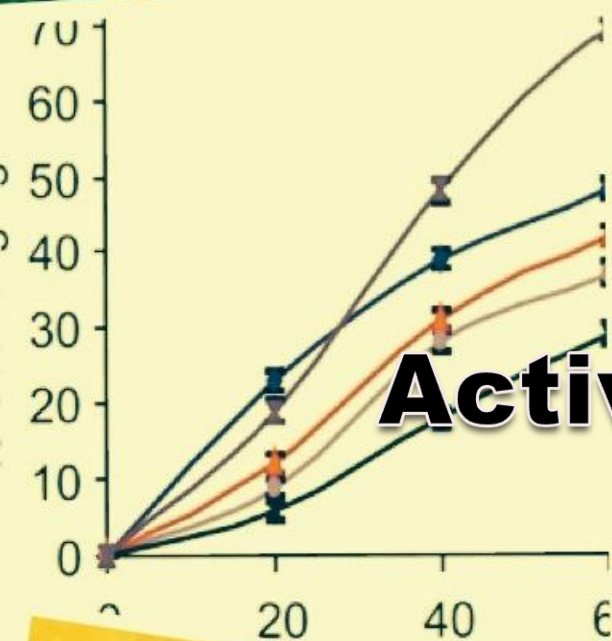
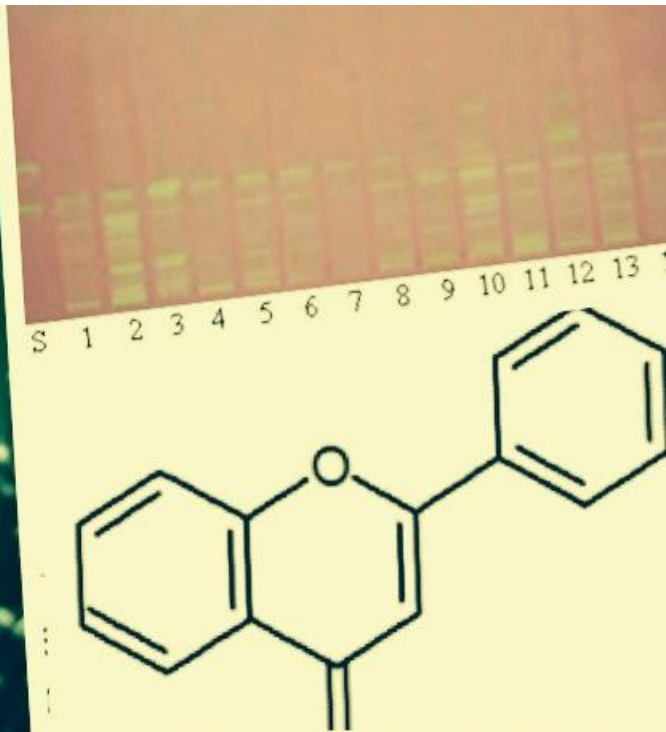


## **Capítulo III: Resultados**

## **Estudios Morfoanatômicos**







## Capítulo IV:

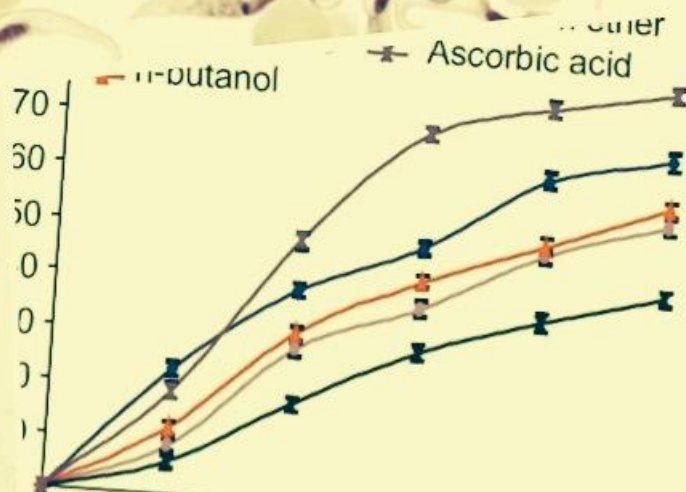
# Actividad Biológica



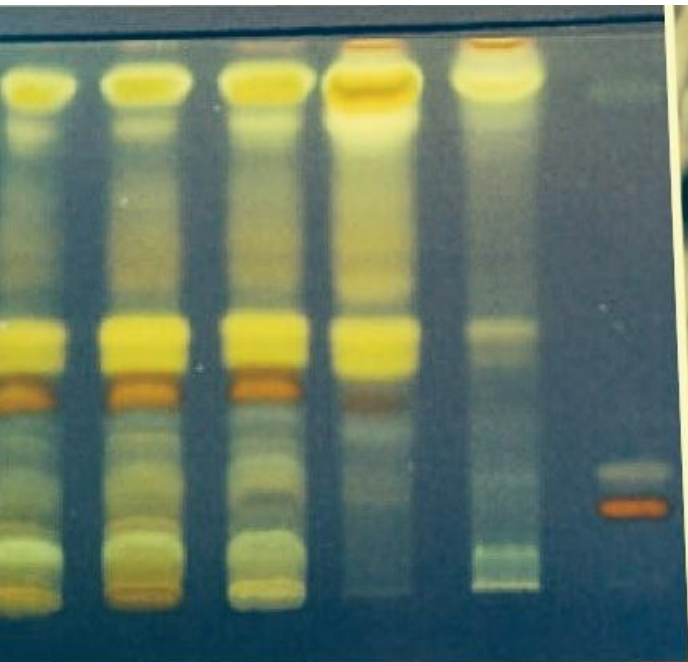




# Capítulo V: Actividad Biológica de los extractos de *Castela tweedii*

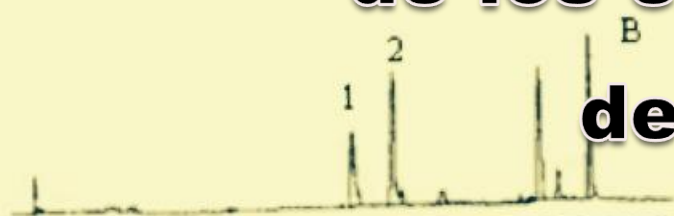






## Capítulo VI:

# Caracterización fitoquímica de los extractos activos de *Castela tweedii*



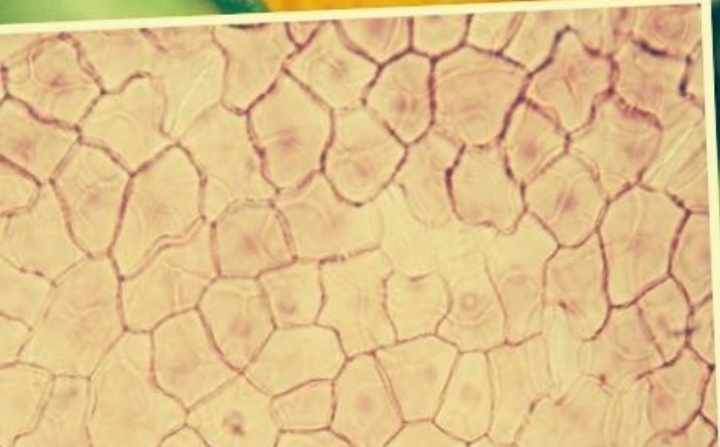




## Capítulo VII:



## Discusión de los Resultados



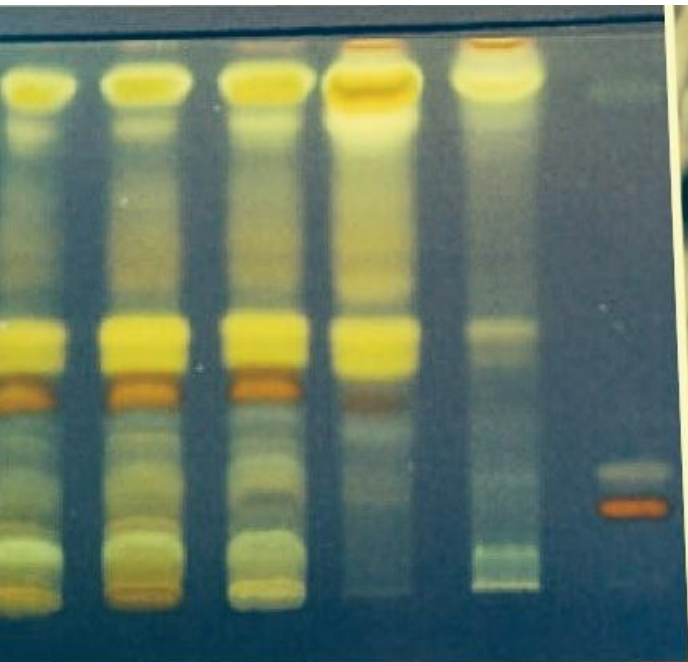




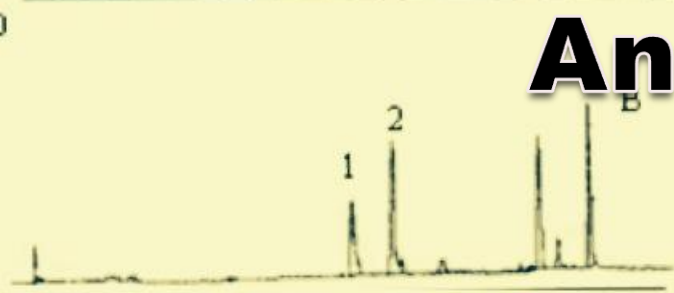
# **Capítulo VIII: Conclusiones**







# Capítulo IX



# Anexo







# Bibliografía





*"The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing."*

*"Lo importante es nunca dejar de investigar. La curiosidad tiene su propia razón para existir"*

*Albert Einstein.*

*...A John.*



### ***Agradecimientos.***

---

A mi directora de tesis, Dra. Martha Gattuso, quien me acompañó en este desafío, brindándose con gran vocación científica y docente, capacidad de trabajo y calidad humana.

A la Dra. Adriana Broussalis, quien también me ha dirigido en la realización de este trabajo, por haberme brindado su tiempo, su espacio, su confianza, su apoyo y enseñanzas.

A la Dra. Susana Gattuso, quien guió mis primeros pasos en este trabajo de tesis, iniciándome en el fascinante mundo de la botánica.

A las Doctoras Ma. Laura Martínez y Adriana Cortadi, por el continuo acompañamiento profesional y personal.

A la Dra. Isabel Nocito por la realización de los ensayos tripanocidas.

A la Dra. Paula López por enseñarme a trabajar con CLAE, por su asesoramiento, dedicación y siempre buena predisposición.

A la Ing. Agr. Dra. Sandra Clemente, a Sofía y a Mariana por la realización de los ensayos insecticidas, por recibirme en su laboratorio y enseñarme sus técnicas.

A Osvaldo Di Sapio, por transmitirme su conocimiento, por su apoyo y ayuda diaria.

A todos y cada uno de mis compañeros de la cátedra de Farmacobotánica, Vicky, Érica, Matías, Gabriel y Ángel, por su ayuda y su apoyo incondicional.

A Ingrid y Verónica, por compartir conmigo su laboratorio y ayudarme a encontrar desde un tubo de ensayo hasta a interpretar un espectro.

A los integrantes de “la Cátedra vecina” de Farmacognosia, por ayudarme siempre con buena predisposición y alegría.

A mis amigas por alegrarme la vida.

Y por último a mis padres, porque siempre apoyaron mis decisiones y siguen siendo mi ejemplo a seguir....



La familia Simaroubaceae ha jugado un prominente rol en la medicina popular en el tratamiento de enfermedades de la piel, como antiparasitario, vermífida y en tratamientos de trastornos del tracto gastrointestinal. En Argentina la familia Simaroubaceae DC. está representada por los géneros *Ailanthus* Desf., *Alvaradoa* Liebm., *Castela* Turpin, *Picramnia* Sw., *Picrasma* Blume y *Simaba* Engl. Existe una especie introducida *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle y siete especies nativas, *Castela coccinea* Griseb., *Castela tweedii* Planch., *Picrasma crenata* (Vell.) Engl., *Simaba glabra* Cronquist, *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl. y *Picramnia sellowii* Planch. De las especies nativas algunas de ellas presentan escasa información reportada, como es *Castela tweedii*, mientras que de *Castela coccinea* sólo hay un trabajo publicado en el que se demostró que sus extractos de hojas tenían una fuerte actividad contra *Plasmodium falciparum*, el agente causante de la Malaria. Si bien ésta posee baja incidencia en nuestro país, esta zona es endémica para el Mal de Chagas, otra enfermedad de origen parasitario causada por el *Tripanosoma cruzi*. Resulta de interés, además, el estudio de la actividad antioxidante, porque a pesar que una planta medicinal es raramente utilizada como antioxidante en la medicina tradicional, sus propiedades terapéuticas pueden deberse a su capacidad depuradora de radicales libres del oxígeno. Con estos antecedentes y teniendo en cuenta los escasos o nulos trabajos realizados en especies nativas de Argentina nos proponemos: realizar una investigación aplicada de las potenciales actividades biológicas, composición química y un estudio morfoanatómico de sus hojas, cortezas y leños de modo de tener, no sólo una identificación morfológica, sino también micrográfica de las mismas, permitiendo la diferenciación de cada especie aún cuando se encuentren molturadas.

El estudio morfoanatómico realizado nos permitió obtener caracteres comunes y diferenciales para cada género y especie que refuerzan el carácter polifílico reportado para esta Familia. Dicho estudio aportó además nuevos datos que podrían contribuir a los últimos reordenamientos taxonómicos propuestos para la Familia Simaroubaceae. Con los caracteres obtenidos se confeccionó una clave diacrítica que facilitaría la delimitación e identificación de cada una de las especies nativas y permitiría la realización de controles de calidad de estas especies como drogas crudas.

Los extractos metanólicos de hojas y cortezas de las siete especies estudiadas mostraron actividad depuradora de radicales libres dosis dependiente. El extracto más activo fue el etanólico de corteza de *A. subovata*, que superó el 80% de inhibición del radical DPPH. El extracto etanólico de hojas de *C. coccinea* fue también muy activo, alcanzando 93% de inhibición del radical DPPH. Esta actividad depuradora de radicales libres fue atribuida a la presencia, en los extractos, de compuestos polifenólicos, principalmente taninos, flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos, justificando, en parte, el uso tradicional atribuido a infusiones de estas especies.



Por otro lado, los extractos diclorometánicos de corteza y madera de *P. crenata* presentaron alta actividad tripanocida, superando el 90% de inhibición del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*.

Los extractos de *C. tweedii* fueron seleccionados para la evaluación de la actividad insecticida frente a una importante plaga de cultivos: *Ceratitis capitata*. Los extractos diclorometánico de madera y metanólico de hojas presentaron actividad insecticida significativa provocando 95% de mortalidad de moscas adultas y un 83% de mortalidad pupal. La caracterización fitoquímica de estos extractos activos nos permitió identificar  $\beta$ -sitosterol y escopoletina en el extracto diclorometánico de madera y ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico y rutina en el extracto metanólico de hoja. La presencia de estos compuestos sugerirían una relación de los mismos con la actividad biológica encontrada para los respectivos extractos. Las actividades halladas para los extractos de *C. tweedii* y el estudio fitoquímico realizado contribuyen al conocimiento de nuestra flora medicinal. Sus extractos y/o principios activos podrían ser utilizados como potenciales agentes terapéuticos en enfermedades antiparasitarias y/o como pesticidas de origen botánico para el control de plagas agrícolas.



The Simaroubaceae family comprises approximately 32 genera and 200 species of tropical and subtropical woody plants closely related to the Rutaceae. In Argentina, the Simaroubaceae is represented by six genera and eight species, one is exotic: *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle., and seven are native: *Castela coccinea* Griseb., *Castela tweedii* Planch., *Picrasma crenata* (Vell.) Engl., *Simaba glabra* Engl., *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl. and *Picramnia sellowii* Planch., (Xifreda, 1999; Xifreda & Seo, 2006) This family has played a prominent role in folk medicine because of its anthelmintic, antiamoebic and insecticide properties and for the treatment of fever and malaria. Despite that Malaria has low incidence in South America, this is an endemic zone for Chagas, another parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*.

On the other hand, although medicinal plants are rarely used as antioxidants in traditional medicine, their claimed therapeutic properties could be partially attributed to their oxygen scavenging capacity.

Morphoanatomical, phytochemical and pharmacological information of some of these species is poor. For these reasons, the present investigation was undertaken to evaluate the anatomical features, biological activity and phytochemical characterization of the native species of Simaroubaceae in order to contribute with the knowledge of the local flora.

It was possible to key out the species and genera using a combination of qualitative and quantitative anatomical features. The leaf, wood and bark characteristics obtained provided new evidence of the heterogeneous nature of the Simaroubaceae *sensu* Engler (1931) and brought further evidence for the new taxonomic arrangements proposed for this family.

Leaf and bark ethanolic extracts of the studied species showed antioxidant activity in a dose-dependent manner. *A. subovata* bark ethanolic extract was the most active, showing 80% of DPPH radical inhibition. *C. coccinea* leaf ethanolic extract was also active, with 90% of DPPH radical inhibition. Responsible compounds for these scavenging activity were characterized as polyphenols, mainly tannins, flavonoids and phenylcarboxylic acids.

On the other hand, *P. crenata* bark and wood dichloromethanic extracts presented high antitrypanocidal activity, showing 90% growth inhibition of *T. cruzi* epimastigotes.

*C. tweedii* dichloromethanic and methanolic extracts were chosen for the evaluation of insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. Wood dichloromethanic extract produced 95% mortality of adult insects, while leaf methanolic extract produced 83% pupal mortality. The phytochemical characterization of these extracts let us the identification of  $\beta$ -sitosterol and scopoletin in Wood dichloromethanic extract and rutin, chlorogenic acid, gallic acid and ellagic acid in leaf methanolic extract. This is the first report showing the presence of these compounds in *C. tweedii* extracts.



El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones, manuscritos y comunicaciones a congresos:

#### **PUBLICACIONES:**

Martínez, M.L., Campagna, M.N., Ratti, M.S., Nocito, I., Serra, E., Gattuso S. y M.A. Gattuso. (2009) "Trypanocide activity of *Castela coccinea* Griseb. Extracts" *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (3), 211-218 ISSN 0717 7917

Cortadi, A., Andriolo, L., Campagna, M.N., Martínez, M.L., Di Sapio, O., Gattuso, M., S. Gattuso. (2009). "Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de Simaroubaceae (*sensu lato*) de Argentina. Parte I. *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl., *Picramnia sellowii* Planch. y *Castela coccinea* Griseb." *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (1), 20-37. ISSN 07177917

Campagna, M.N., Ratti, M.S., Sciara, M., García Vescovi, E., Gattuso M. y M. L. Martínez. (2011) "Biological activities of *Castela coccinea* Griseb. extracts." *Lat. Am. J. Pharm.* 30 (1): 39-44. ISSN 0326-2383.

Di Sapio, O., Campagna, M.N., Rodriguez, M.V., Martínez, M.L., Cortadi, A., y M Gattuso. (2012) "Parámetros microgáficos para la identificación de leño, corteza, y hoja de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)" *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(2) 172-187. ISSN 0717 7917

Campagna, M.N., Martínez, M.L., Broussalis, A., Gattuso, M. (2012) "Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae). *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11 (6): 498 - 509

Campagna, M.N., Di Sapio, O. y Gattuso, M. (2013). Parámetros micrográficos para la identificación de hojas, corteza y leño de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. (Simaroubaceae). *Dominguezia*, 29 (1): 17-28.

#### **PRESENTACIONES A CONGRESOS:**

Nocito, I., Campagna, M.N., Martínez, M.L., Gattuso, M., Serra, E. "Evaluación de la Actividad Tripanocida y Citotóxica de *Castela coccinea*". XXII Reunión Científica Anual



Sociedad Argentina de Protozoología. 11-13 de noviembre de 2007. IIB INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

Campagna, M.N., Martinez, M.L., Ratti, S., Di Sapio, O., Sciara, M., Scandizzi, A., Cortadi, A., Gattuso, S., Gattuso, M. "Anatomical characterization, antibacterial and free-radical scavenging activities of *Castela coccinea* Griseb. (Simaroubaceae)". XX Simposio de Plantas Medicinales de Brasil y X Congreso Internacional de Etnofarmacología. 16 al 19 de septiembre 2008, San Pablo, Brasil.

Martínez, M.L., Campagna, M.N., Nocito, I., Serra, E., Gattuso, S. "Evaluación de la actividad tripanocida de especies autóctonas de la Familia *Simaroubaceae sensu lato*". VIII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Sociedad Argentina de Protozoología, 2 al 5 de noviembre 2008, Rosario, Argentina.

Cortadi, A., Campagna, M.N., Martinez, M.L., Di Sapio, O., Scandizzi, A., Andriolo, L., Betucci, G., Ferretti, M., García, M., Cialoni, A., Gattuso, S. "Estudios micrográficos y determinación de actividad antioxidante de tres especies argentinas de la familia *Picramniaceae*". X Congreso y XVIII Reunión Anual de la Sociedad De Biología de Rosario, 3 al 5 de diciembre 2008, Rosario, Argentina.

Cortadi, A., Campagna, M.N., Di Sapio, O., Scandizzi, A., Andriolo, L., Gattuso, S., Gattuso, M., Martinez, M.L. "Estudios Micrográficos y evaluación de la actividad antioxidante de especies de Simaroubaceae (*sensu lato*) de Argentina". I Congreso Internacional de Farmacobotánica de Chile", 6 al 10 de enero 2009, Chillan, Chile.

Cortadi, A.; Andriolo, L.; Campagna, M.N., Martínez, M.L., Rodríguez, M.V., Di Sapio, O. y Gattuso, S." Estudios micrográficos de los leños de tres especies de la Familia Picramniaceae, que crecen en forma espontánea en la República Argentina". V Congreso Internacional de Etnobotánica, 21 al 24 de septiembre de 2009, San Carlos de Bariloche, Argentina.

Campagna, M.N., Martínez, M.L., Di Sapio, O., Cortadi, A. y Gattuso, S. "Estudios morfoanatómicos y de la actividad antioxidante de hojas, corteza y leño de *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. (Simaroubaceae). V Congreso Internacional de Etnobotánica, 21 al 24 de septiembre de 2009, San Carlos de Bariloche, Argentina.

Campagna, M.N., Di Sapio, O., Martínez, M.L., Cortadi, A., Nocito, I., y Gattuso, S. "Estudio morfoanatómico, fitoquímico y tripanocida de Hojas, cortezas y leños de



Simaroubaceae (*sensu lato*) de Argentina". XXXII Jornadas Argentinas de Botánica, octubre 2009, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.

Andriolo, L., Campagna, M.N., Di Sapio, O., Scandizzi, A., Ferreti, M., Cortadi, A., y Gattuso, S. "Estudio anatómico comparativo de los leños de especies nativas de los géneros *Picramnia* y *Castela* (Simaroubaceae *sensu lato*) .XI Congreso XXIX Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario, 3 y 4 de diciembre de 2009, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Andriolo, L., Martínez, M.L., Campagna, M.N., Di Sapio, O. y Cortadi, A. "Estudio farmacobotánico, fitoquímico y determinación de actividad antioxidante de hojas, cortezas y leños de *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl. y *Picramnia sellowii* Planch. (Picramniaceae) de Argentina." II Jornadas de Ciencia y Tecnología, 10 de diciembre de 2009, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Pulido Garcia, L., Di Sapio, O., Nocito, I., Campagna, M.N., y Gattuso, M. "Anatomical Characterization, anti-trippanocide and free radical scavenging activities of *Castela tweedii* Planch. (Simaroubaceae)". 11<sup>th</sup> Congress of the International Society of Ethnopharmacology. 20 al 25 de Septiembre 2010, Albacete, Castilla-La Mancha, España.

Campagna, M.N., Martínez, M.L., Nocito, I., Di Sapio, O., Cortadi, A., y Gattuso, M. "Estudios Morfoanatómicos y Actividad Biológica de especies del género *Castela* (Simaroubaceae) de Argentina." X Simposio Argentino XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, 24-26 de noviembre 2010, Córdoba, Argentina.

Reynoso Arriola, S., Sagesse, M., Campagna, M.N., Gattuso, M., Broussalis, A.M., Clemente, S.V. "Actividad biológica de extractos de *Castela tweedii* Planch. (Simaroubaceae) sobre larvas de *Ceratitis capitata* Weid, plaga de frutales" XXXIV Congreso Argentino de Horticultura, 27al 30de Noviembre de 2011, Buenos Aires, Argentina.

Campagna, M.N., Gattuso, M., Reynoso, S., Sagesse, M., Clemente, S. y Broussalis, A. "Actividad insecticida y análisis fitoquímico de los extractos de *Castela tweedii* (Simaroubaceae)". XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. 7 al 10 de octubre de 2011, Posadas, Misiones, Argentina.

Campagna, M.N., Di Sapio, O., Martínez, M.L., Cortadi, A., y Gattuso M. "Caracteres Morfoanatómicos y Capacidad Antioxidante y Antiparasitaria de *Picrasma crenata*". XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de Sociedad Biología. 1 al 2 Diciembre 2011, Rosario, Santa Fe, Argentina. .pp. 60, ISSN: 1668-0154



Campagna, M.N., Payeska, B., Gattuso, M., Broussalis, A., y Clemente, S. "Estudio comparativo de la acción insecticida producida por extractos diclorometánicos de *Castela tweedii* Planch sobre *Ceratitis capitata* Wied. y *Tribolium castaneum* Herbst." VIII Congreso Argentino de Entomología, 17 al 20 de abril de 2012, Bariloche, Argentina.

Campagna, M.N., Cortadi, A., Martínez, M.L., Di Sapio, O., y Gattuso M. "Caracterización micrográfica y fitoquímica de *Picramnia parvifolia*", VI Jornadas de Ciencia y Tecnología – Difusión de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR – Foro Permanente de Discusión de Ciencia y Tecnología, Secretaría de Ciencia y Tecnología, UNR – 14 Noviembre 2012.

Martínez, M.L, Orellano, E., Rodriguez, M.V., Campagna, M.N., Di Sapio, O., Anders Apels, M., Cortadi, A., y Gattuso, M. "Biopesticides of plant origin. Study of the effect of *Castela coccinea* extracts on phytopathogenic bacteria *Xanthomonas citri*" 2da. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (Ricita) 22 y 23 Noviembre de 2012. Rosario, Argentina

Campagna, M.N., Clemente, S., López, P., Nocito, I., Broussalis, A., y Gattuso, M. "Biological activity and phytochemical characterization of *Castela tweedii* extracts". 2da. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (Ricita) 22 y 23 Noviembre de 2012. Rosario, Argentina.

Di Sapio, O., Campagna, M.N., Ferragut, F., Martínez, M.L., Cortadi, A., y Gattuso, M. "Micrografía y actividad antiparasitaria del leño de *Picrasma crenata* (Vell) Engl." XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica, 2 al 6 de septiembre de 2013, La Plata, Argentina

*Abreviaturas y Símbolos.*

?: porcentaje

%P/V: unidad de concentración peso en volumen

%V/V: unidad de concentración volumen en volumen

µg: microgramos

µL: microlitros

µm: micras

Aa: *Ailanthus altissima*

Abs.: absorbancia

AcOEt: acetato de etilo

APG: Angiosperm Phylogeny Group

AS: anisaldehído sulfúrico

As: *Alvaradoa subovata*

°C: grados centígrados

Cc: *Castela coccinea*

CC: cromatografía en columna

CCD: cromatografía en capa delgada

CG: cromatografía en fase gaseosa

CI<sub>50</sub>: concentración Inhibitoria del 50 %

CLAE: cromatografía líquida de alta eficiencia

CLAE-DAD: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodo

cm: centímetros

col.: colaboradores

Ct: *Castela tweedii*

DCM: diclorometano

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenilpicrilhidrazilo

EAT: ensayo por exposición al alimento tratado

EDAX: energy dispersive X-ray analysis, (análisis de dispersión de energía por rayos x)

EPFI: ensayo de exposición en papel de filtro impregnado

EtOH: etanol

ERO: especies reactivas del oxígeno

FAA: alcohol etílico 70°, ácido acético glacial, formaldehído y agua (50:5:30:15). Formaldehído.

FE: fase estacionaria

FeCl<sub>3</sub>: tricloruro férrico

FM: fase móvil

g: gramos



h: hora  
 HR: humedad relativa  
 IM: índice de mesomorfía  
 IV: índice de vulnerabilidad  
 KeV: kilo electrón volt  
 KOH: hidróxido de potasio  
 M: unidad de concentración, molaridad  
 Mc: mortalidad corregida  
 MEB: microscopio electrónico de barrido  
 MeOH: metanol  
 mg: miligramos  
 min.: minutos  
 mL: mililitros  
 mm Hg: milímetros de mercurio  
 mM: milimolar  
 MO: microscopio óptico  
 Mort.: mortalidad  
 nm: nanómetros  
 OMS: Organización Mundial de la Salud  
 Pc: *Picrasma crenata*  
 PEG: polietilenglicol  
 PM: peso molecular  
 Pp: *Picramnia parvifolia*  
 ppm: partes por millón  
 Ps: *Picramnia sellowii*  
 Rf: relación de frente  
 RPN: reactivo de productos naturales  
 T: temperatura  
 TP<sub>50</sub>: tiempo de pupariación medio  
 Tr: tiempo de retención  
 UV: espectroscopia ultravioleta  
 V: volt  
 vs: versus  
 λ: longitud de onda  
 λ<sub>max</sub>: longitud de onda máxima

## Índice

Resúmen	i.
Abstract	iii.
Publicaciones y Presentaciones a Congresos	iv.
Abreviaturas	viii.
Índice	x.
 CAPÍTULO I: Introducción	 1.
Importancia del Estudio de la Flora Argentina	3.
Familia Simaroubaceae DC.	4.
Las Simaroubaceae Nativas Argentinas	7.
Antecedentes de las Familia Simaroubaceae	12.
Usos Medicinales de la Familia	14.
Fitoquímica de la Familia	16.
Cuasinoides	16.
Alcaloides	18.
Compuestos Polifenólicos	19.
Cumarinas	19.
Flavonoides	21.
Evaluación de la Actividad Biológica	22.
Actividad Antioxidante	22.
Actividad Tripanocida	24.
Actividad Insecticida	27.
Objetivos	31.
 CAPÍTULO II: Materiales y Métodos	 32.
1-Material Vegetal	32.
2-Metodología para el Estudio Morfoanatómico	36.
2.1-Técnicas para la observación con MO	36.
Técnica de Corte a mano libre	37.
Técnica de inclusión en Parafina	37.
Técnica de inclusión en Resina	39.
2.2-Técnicas para la observación con MEB	42.
2.3- Pruebas Histoquímicas	43.
3- Metodología para la Evaluación de la Actividad Biológica	43.
3.1-Obtención de los extractos	43.



3.2-Ensayos de Actividad Antioxidante: Análisis de la Capacidad	
Depuradora de Radicales Libres	45.
3.2.1-Análisis Cuantitativo	45.
3.2.2-Análisis Cualitativo	46.
3.3-Ensayo Actividad Tripanocida	47.
4-Metodología para la Evaluación de la Actividad Biológica de <i>Castela tweedii</i>	47.
4.1-Ensayo de Actividad Tripanocida	48.
4.2-Ensayos Actividad Insecticida	48.
4.2.1-Bioensayos	48.
4.2.2-Ensayo de Exposición a Alimento tratado (EAT)	49.
4.2.3-Ensayo de Exposición a papel de filtro impregnado (EPFI)	50.
4.2.4-Análisis Estadístico	50.
5-Characterización Fitoquímica de los extractos bioactivos de <i>C. tweedii</i>	50.
5.1-Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	50.
5.2-Cromatografía en Columna (CC)	52.
5.3- Cromatografía en Fase Gaseosa (CG)	52.
5.4-Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	53.
5.5-Extracción Líquido-Líquido	53.
 CAPÍTULO III: Resultados Estudio Morfoanatómico	 54.
<i>Ailanthus altissima</i>	54.
<i>Alvaradoa subovata</i>	70.
<i>Castela coccinea</i>	84.
<i>Castela tweedii</i>	99.
<i>Picramnia parvifolia</i>	115.
<i>Picramnia sellowii</i>	130.
<i>Picrasma crenata</i>	144.
 CAPÍTULO IV: Resultados Actividad Biológica	 159.
1-Rendimiento de los extractos	159.
2-Actividad Antioxidante: Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres	161.
2.1-Análisis Cuantitativo	161.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres	
de los Extractos de <i>A. altissima</i>	161.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres	
de los Extractos de <i>A. subovata</i>	163.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres	
de los Extractos de <i>C. coccínea</i>	164.

Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos de <i>C. tweedii</i>	166.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos de <i>P. parvifolia</i>	167.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos <i>P. sellowii</i>	169.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos <i>P. crenata</i>	170.
Discusión breve de los Resultados	172.
2.2-Análisis Cualitativo	174.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>A. altissima</i>	174.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>A. subovata</i>	175.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>C. coccínea</i>	178.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>C. tweedii</i>	180.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>P. parvifolia</i>	182.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>P. sellowii</i>	184.
Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales Libres de los Extractos activos de <i>P. crenata</i>	185.
Discusión breve de los Resultados	186.
CAPÍTULO V: Resultados Actividad Biológica de los extractos de <i>C. tweedii</i>	190.
1.-Rendimiento de los extractos	190.
2.-Actividad Tripanocida	190.
3.-Actividad Insecticida	192.
3.1-Ensayo por exposición a alimento tratado	192.
3.2-Ensayo por inhalación	194.
Discusión breve de los Resultados	196.
CAPÍTULO VI: Caracterización Fitoquímica de los extractos bioactivos de <i>C. tweedii</i>	197.
1-Characterización Fitoquímica del extracto diclorometánico de madera	197.
Discusión breve: Caracterización Fitoquímica del extracto diclorometánico de madera	208.
2- Caracterización Fitoquímica del extracto metanólico de hojas	209.



2.1-Análisis por CLAE de la Fracción H <sub>AcoEt</sub>	211.
2.2-Análisis por CLAE de la Fracción H <sub>acuoso</sub>	213.
Discusión breve: Caracterización Fitoquímica del extracto metanólico de hojas	217.
 CAPÍTULO VII: Discusión de los Resultados	 219.
Estudio Morfoanatómico	219.
Actividad antioxidante	228.
Actividad Tripanocida	230.
Actividad Biológica de los extractos de <i>C. tweedii</i>	232.
Actividad Tripanocida	232.
Actividad Insecticida	233.
Caracterización Fitoquímica de los extractos bioactivos de <i>C. tweedii</i>	234.
 CAPÍTULO VIII: Conclusiones	 236.
 CAPÍTULO IX: Anexo	 241.
CAPÍTULO X: Bibliografía	245.



"Arum maculatum", del "Codex Vindobonensis 93", copia del Dioscórides (512 d.JC.)

Durante la historia de la civilización, las plantas proveyeron al hombre de comida, refugio, ropa, fragancias y también de las medicinas. El conocimiento empírico acerca de las plantas medicinales y sus efectos curativos se fue acumulando durante el transcurso de los años y actualmente es parte integral de los sistemas de salud en distintos países. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) una planta medicinal es cualquier planta utilizada con la finalidad de aliviar, prevenir y/o curar una enfermedad o de alterar procesos psicológicos y patológicos, o cualquier planta empleada como fuente de drogas o precursores de estas (Arias, 1999). A pesar de que algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a ciertas plantas fueron demostradas como erróneas a lo largo de los años, la fitoterapia está basada en descubrimientos empíricos de cientos y miles de años (Gurib-Fakim, 2006.) Las culturas ancestrales fueron conocidas por su colección sistemática de información sobre hierbas medicinales y por sus ricas y bien definidas Farmacopeas. Existe una amplia evidencia arqueológica que indica que las plantas medicinales fueron regularmente utilizadas por el ser humano desde tiempos prehistóricos. En distintas culturas ancestrales los productos botánicos eran ingeridos con propósitos curativos y psicoterapéuticos (Halberstein, 2005). Las grandes civilizaciones de la antigüedad nos dejaron evidencia escrita de la ingeniosa utilización de las plantas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Así, encontramos el "*Rig Veda*", uno de los libros sagrados del brahmanismo escrito entre el 4500 a.C y 1600 a.C que describe alrededor de 67 plantas medicinales (Kunwar y Bussmann, 2008), el "*Pen Tsao*", escrito aproximadamente en el año 2500 a.C, en el que se exponen los usos de distintas hierbas medicinales chinas, y el Papiro de Ebers que constituye el documento egipcio más antiguo que registra el uso de plantas medicinales (Leonti y col., 2010).

En la antigua Grecia, Teofrasto (371– h.287 a.C), considerado por muchos como "el padre de la botánica", fue quien realizó la primera clasificación sistemática de las plantas basada en sus propiedades médicas, sus escritos más importante son dos voluminosos tratados botánicos: "*De historia plantarum*" (Historia de las plantas) y "*De causis plantarum*" (Sobre las causas de las plantas). Estos tratados constituyen la más importante contribución a la ciencia botánica de toda la antigüedad hasta el Renacimiento. El primer escrito de naturaleza científica en la época clásica fue "*De materia medica*", de Dioscórides (40-90 d.C), que sentó las bases de las farmacopeas modernas, describe, entre otras cosas, las propiedades de más de 600 plantas, incluyendo formas de preparación, usos y efectos secundarios. Muchas de las plantas descritas se encuentran en uso en la actualidad, como por ejemplo, el té de corteza de sauce, precursor de la aspirina (Haas, 1996). Fue recién en el siglo XIX que el hombre comenzó a aislar los principios activos de estas plantas medicinales, y un hito lo constituyó el descubrimiento de la quinina extraída de la corteza de la *Cinchona* por los farmacéuticos franceses J.B. Caventou y P.J. Pelletier. Tal descubrimiento despertó un interés por las plantas



del “nuevo mundo” comenzando innumerables expediciones a las selvas y bosques americanos en busca de nuevas medicinas. Así, se aislaron una serie de productos naturales de plantas superiores, muchos de los cuales aún son utilizados: la morfina y la codeína del látex de la amapola (*Papaver somniferum*), la digoxina de las hojas de *Digitalis* spp., atropina y hioscina aisladas de distintas especies de Solanáceas, entre otras. A pesar de estos descubrimientos, el impacto de la fitoquímica sobre el desarrollo de nuevas drogas fue disminuyendo y la industria farmacéutica se concentró en la química de síntesis. El vínculo histórico que existía entre las plantas y la salud humana comenzó a debilitarse en 1897, cuando Friedrich Bayer and Co. presentó al mundo el ácido acetilsalicílico sintético (aspirina). Sin embargo, durante los últimos años, la atención de las industrias farmacéuticas se ha volcado nuevamente al mundo de los productos naturales, un caso ejemplar lo constituye el taxol: descubierto en el año 1962 en la corteza de *Taxus brevifolia*, o la artemisina, que fue aislada en el año 1970 como principio activo de la hierba antimalárica china *Artemisia annua* (Phillipson, 2001). Las aplicaciones clínicas del taxol y la artemisina han servido para revivir el interés por las plantas como fuente de nuevas drogas (Phillipson, 1999a). Este retorno progresivo hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica o como fuente de nuevos fármacos ha sido estimulado, en parte, por el regreso a lo natural que se ha producido en forma genérica en la sociedad. En la actualidad, entre el 25% y el 30% de las drogas recetadas en el mundo poseen algún componente derivado de las plantas. Se ha estimado que el 60% de las drogas antitumorales y anti infecciosas del mercado o bajo investigación son de origen natural. De las 252 drogas consideradas básicas y esenciales por la OMS, 11% son exclusivamente de origen vegetal, un número significativo son drogas sintéticas obtenidas de precursores naturales y otras, que tuvieron un origen natural, ahora son sintetizadas químicamente (OMS, <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHOEDMTRM2002.1spa.pdf>).

De las 250.000 especies de plantas conocidas en todo el mundo (de un total aproximado de 700.000 existentes), sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y mucho menor fue la fracción sometida a ensayos biológicos (Cragg y Newman, 2001). Sumado a esto, es preocupante saber que una de cada ocho especies de plantas conocidas están en la categoría de especies en riesgo de extinción, lo que constituye otro factor a tener en cuenta en el estudio de las plantas medicinales (Newman y col., 2003). Por todas las ventajas que presentan los productos naturales, distintos autores (Newman y col., 2003; Verpoorte, 2007) son partidarios de que la exploración de la naturaleza debe expandirse cada vez más con el fin de encontrar nuevos agentes activos que puedan servir como tales ó como modelos para la elaboración de drogas eficaces para el tratamiento de enfermedades, particularmente aquellas difíciles de erradicar.

En Latinoamérica ha habido, en los últimos años, un gran progreso en el estudio de las plantas medicinales (Calixto, 2005), sin embargo, todavía no existen catálogos completos de

las especies medicinales nativas de muchos países. En Argentina, la composición de la etnofarmacopea nativa se ha incrementado considerablemente especialmente debido a la contribución de estudios etnobotánicos detallados realizados en diferentes comunidades rurales y aborígenes donde los sistemas primarios de salud continúan dependiendo de sus medicinas tradicionales herbarias. Los constituyentes químicos y la actividad biológica son aspectos pobremente explorados de la Flora Medicinal Argentina, probablemente debido a la falta de políticas y leyes que avalen el uso de las plantas medicinales para satisfacer las necesidades en el área de la salud, y al poco interés de realizar estudios que avalen los usos tradicionales por parte de la comunidad científica. Debido a su riqueza florística y trasfondo empírico mencionado, la bioprospección farmacéutica constituye un terreno prometedor en nuestro país.

### ***IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA FLORA ARGENTINA.***

Argentina es el país con clima templado más extenso en Suramérica. Gran parte de su biodiversidad puede deberse al hecho de que en nuestro territorio convergen diferentes regiones biogeográficas (Zuloaga y col., 1999, 2008). La gran extensión de superficie continental (2.791.810 km<sup>2</sup>), así como sus variadas características topográficas y climáticas, son fundamentales para la formación de una de las floras más ricas del neotrópico sureño. Nuestro país se caracteriza por el amplio rango de macro hábitats que transcurren a través de gradientes de altura y climáticos, desde los 7.000 m de altura hasta las planicies de las costas, y desde climas subtropicales a polares (Barboza y col., 2009).

La flora medicinal nativa argentina comprende 1.619 taxones (especies y taxones intraespecíficos) y se agrupa en 175 familias y 688 géneros de plantas vasculares (Barboza, 2013). La flora vascular argentina comprende 10.937 taxones (<http://www2.darwin.edu.ar/planCatavasc.>), los taxones utilizados en la medicina tradicional o popular representan el 14% de la flora total. El 85% de la flora medicinal está constituido por Dicotiledóneas, el 9,94% por Monocotiledóneas, el 3,66% por Pteridófitas y el 0,85% restante por Gimnospermas. De acuerdo con Barboza y col., (2009) la composición química de más del 45% de estas especies aún no ha sido analizada. La falta de conocimiento farmacológico es aún más evidente, dado que la actividad biológica de casi el 58% de la flora medicinal aún no ha sido evaluada.

Las provincias de Salta, Tucumán y Jujuy en la región del noroeste y las de Misiones, Corrientes, Entre Ríos y Chaco en la región del noreste, constituyen las áreas más ricas en flora medicinal de la Argentina (Barboza y col., 2009) (ver Tabla 1). Cabe destacar que el 7,52% de esta flora medicinal corresponde a especies endémicas, estas viven exclusivamente en un área geográfica restringida y única (Zuloaga y col., 1999). El alto grado de endemismo



que presenta la flora argentina representa un reservorio genético de incalculable valor, aún poco conocido, de allí la importancia de abordar su estudio en forma interdisciplinaria.

Provincias	Flora Nativa	Flora Medicinal
Salta	3432	795
Tucumán	2662	666
Jujuy	3045	756
Corrientes	2907	746
Misiones	3166	596
Entre Ríos	2149	564
Chaco	1802	619
Buenos Aires	2241	611
Córdoba	1929	648
Catamarca	2065	598
Santa Fe	1783	519
Santiago del Estero	953	439
Chubut	1345	245
Formosa	1599	554
La Pampa	1010	339
La Rioja	1450	434
Mendoza	1738	378
Neuquén	1691	357
Rio Negro	1677	324
San Juan	1364	433
San Luis	1097	394
Santa Cruz	1037	163
Tierra del Fuego	672	96

**Tabla 1:** Flora nativa y medicinal argentina (Barboza y col., 2009)

### ***FAMILIA SIMAROUBACEAE DC.***

Simaroubaceae es una familia esencialmente tropical que cuenta con aproximadamente unas 200 especies distribuidas en 30 géneros (Cronquist, 1981). El centro de diferenciación principal de esta familia se encuentra en América Tropical con otro secundario en África occidental tropical. La familia es morfológicamente muy diversa, y se la considera como un ensamble heterogéneo de géneros bien definidos, lo que provoca que la familia presente, en general, un alto grado de polifilia.

En general son plantas leñosas dioicas, árboles, arbustos o subarbustos con sustancias amargas en la corteza. La mayoría posee hojas compuestas, alternas, pinadas, en general sin estípulas; los folíolos son oblongos. Las inflorescencias se disponen en racimos o cimas, rara vez solitarias. Las flores son pequeñas, actinomorfas, en general diclamídeas e imperfectas, rara vez perfectas. Los sépalos 3 a 5 (raro 8), libres o soldados. Pétalos 3 a 5 (8), libres o unidos en la base, rara vez ausentes, de pre-floración imbricada o valvar. Disco nectarífero entre androceo y gineceo, a menudo lobulado. Estambres libres, isostémonos o diplostémonos, insertos en el disco, raramente ausentes o reducidos a estaminodios en flores pistiladas; anteras bitecas, tetra esporangiadas de dehiscencia longitudinal. Gineceo formado por 2 a 5 (8) carpelos libres o unidos; rudimentario o ausente en las flores estaminadas; inserto en un ginóforo o rodeado por un disco. Ovario súpero con 1 o 2 óvulos anátropos por carpelo. Estilo libre o parcialmente soldado. Fruto generalmente indehiscente, drupa, baya o sámara con 2 a 5 (8) carpelios drupáceos o samaroides; lóculos en general uniseminados, rara vez dos, embrión en general recto, endosperma ausente o escaso. Los granos de polen son tricolpados, oblato esferoidales a prolatos con exina reticulada, estriada o espinulosa (Pirani, 1987; Xifreda y Seo, 2006).

Según Engler (1931), la posición natural de la familia Simaroubaceae corresponde al orden Geraniales debido a que poseen hojas compuestas, flores diclinas y semillas sin endosperma. Posteriormente, (Engler, 1964; Dahlgren, 1980) las reubica dentro del orden Rutales por poseer óvulos epítropos. Cronquist (1944d, 1981) al agregar nuevas características, como ser la ocurrencia de un androceo haplostémono o diplostémono, de discos nectaríferos muy desarrollados, un ovario sincárpico y fundamentalmente por la presencia de sustancias amargas características en sus leños y cortezas, las ubica dentro del orden Sapindales, con afinidades cercanas a las Rutaceae, Burseraceae, Meliaceae y Cneoraceae. Por último, los estudios de variaciones de secuencias de los genes codificados en cloroplastos (rbcL sequence data) aportaron nuevas evidencias que permitieron establecer de manera clara la polifilia de la familia, ubicándola, al igual que lo propuesto por Cronquist, dentro del orden Sapindales (Fernando y Quinn, 1995). El nuevo sistema de clasificación, Angiosperm Phylogeny Group III (APG III), las ubica dentro del clado Málvidas, manteniendo su ubicación dentro del orden Sapindales (Bremer y col., 2009; Haston y col., 2009).

Tradicionalmente, las **Simaroubaceae sensu Engler** se encuentran divididas en seis subfamilias y nueve tribus (Engler 1931, Scholz 1964):

**Subfamilia SURIANOIDEAE:** incluye los géneros: *Suriana*, *Cadellia*, *Guilfoylia* y *Recchia*. Cronquist, (1944d) y Dahlgren (1989) elevaron esta subfamilia al rango de familia: Surianaceae, ubicándola en el orden Rosales.

**Subfamilia SIMAROUBOIDEAE:** comprende la mayoría de los géneros: *Quassia*, *Simarouba*, *Simaba*, *Samadera*, *Hannoa*, *Eurycoma*, *Harrisonia*, *Castela*, *Holacantha*, *Brucea*, *Picrasma*, *Ailanthus*, *Picrolemma*, *Perriera*, *Gymnostemon*, *Soulamea* y *Amaroria*. Los



caracteres comunes de los miembros de este grupo son aquellos que son considerados como atributos típicos de la familia, como ser: la presencia de cuasinoides, carpelos separados con estilos unidos, frutos drupáceos, filamentos con apéndices y la presencia de flores unisexuales.

**Subfamilia KIRKIOIDEAE:** incluye los géneros: *Kirkia* y *Pleiokirkia*. Fue elevada al rango de familia por Takhtajan (1973, 1987) (Fernando y Quinn, 1992)

**Subfamilia IRVINGIOIDEAE:** incluye los géneros: *Klainedoxa*, *Irvingia*, y *Desbordesia*. Takhtajan la reconoce como una nueva familia: Irvingiaceae, y la ubica en el orden Rutales (Takhtajan, 1987).

**Subfamilia PICRAMNIOIDEAE:** comprende un único género: *Picramnia*

**Subfamilia ALVAROIDEAE:** comprende un único género: *Alvaradoa*

Con respecto a Picramnioideae y Alvarioideae, Cronquist (1944d) sugiere que existe una relación muy cercana entre los géneros *Alvaradoa* y *Picramnia* debido a que ambos poseen 2 a 3 carpelos fusionados con dos óvulos por carpelo, estambres oposipétalos, e inflorescencias en racimos largos y péndulos de flores pequeñas. Además comparten caracteres distintivos en sus hojas (Jadim, 1901) y en la anatomía del pericarpio (Fernando y Quinn, 1992). Fitoquímicamente son los únicos géneros en Simaroubaceae *sensu Engler* que no poseen cuasinoides y producen antraquinonas (Hegnauer, 1983; Simão y col., 1991). Fernando y Quinn (1992, 1995) basados en sus estudios de análisis de las secuencias rbcL, demuestran la separación de estos dos géneros del resto de los géneros que integran la familia, ubicándolos fuera de la Familia Simaroubaceae, y más aún fuera del orden Sapindales, y proponen una nueva Familia: Picramniaceae, que incluye a los géneros *Picramnia* y *Alvaradoa* (Fernando y Quinn, 1995). En el último sistema de clasificación propuesto, The Angiosperm Phylogeny Group (Haston y col., 2009), los géneros *Alvaradoa* y *Picramnia* se encuentran formando parte de un nuevo orden: Picramniales, que contiene una única Familia: Picramniaceae, con solo esos dos géneros. En esta tesis se adoptó la clasificación propuesta originalmente por Engler (1931) y Cronquist (1944a, 1981), donde los géneros *Picramnia* y *Alvaradoa* quedan incluidos dentro de la Familia Simaroubaceae.

Cronquist (1944d) reconoce 12 géneros americanos para la Familia:

-**Suriana** L., género tropical con una única especie, que se distribuye desde el sur de Florida (Estados Unidos de América, EUA) hasta Brasil (Cronquist, 1944d).

-**Recchia** Sessé & Moc. Ex DC., con dos especies, ambas nativas de México.

-**Picramnia** Sw. nom. cons., es el género más extenso, con aprox. 40 especies neotropicales distribuidas desde Florida (EUA), México e Indias Occidentales hasta Suramérica (Sur de Brasil, Paraguay y Argentina)

-**Alvaradoa** Liebm., con 5 especies de distribución muy variada: una especie está restringida a Suramérica, otra se encuentra en el Sur de Florida (EUA), Cuba, Las Bahamas, América Central y México y las 3 restantes son especies endémicas de la isla La Española, Cuba y Jamaica

-**Castela** Turp., con 12 especies, dos de ellas sólo se encuentran en Suramérica, desde Bolivia y Paraguay hasta Argentina y Brasil; tres especies son endémicas de Cuba, una de Jamaica, y otra de La Española. Cuatro especies se distribuyen por el Suroeste de Estados Unidos hasta México y la última desde Texas y México al norte de Suramérica del Sur y las islas Galápagos (Thomas, 1990a).

-**Holocantha** A. Gray, con dos especies, una se encuentra en Arizona y Sur de California (EUA) y la otra en México (Cronquist, 1944d).

-**Picrasma** Blume., con 6 especies, con una especie distribuida por Suramérica y las restantes desde el Norte de América del sur hasta México y las Indias Occidentales

-**Picrolemma** Hook. f., con dos especies, una se encuentra en Colombia y Perú, y la otra en la cuenca Amazónica.

-**Simarouba** Aubl., género neotropical con 6 especies distribuidas desde Florida (EUA), México, Antillas hasta Bolivia y Sur de Brasil (Cronquist, 1944b).

-**Simaba** Aubl., es el segundo género neotropical más extenso, con 24 especies distribuidas principalmente en la cuenca del Amazonas hasta Suramérica (Cronquist, 1944c).

-**Quassia** L. con una única especie, de distribución continua desde Guyana, Venezuela y Colombia hasta el norte de Nicaragua. (Thomas, 1990a) (Fig.6).

-**Ailanthus** Desf., una especie naturalizada, cultivada desde Estados Unidos hasta Argentina. El género es nativo de Asia Oriental y cuenta con 15 especies (Cronquist, 1944d).

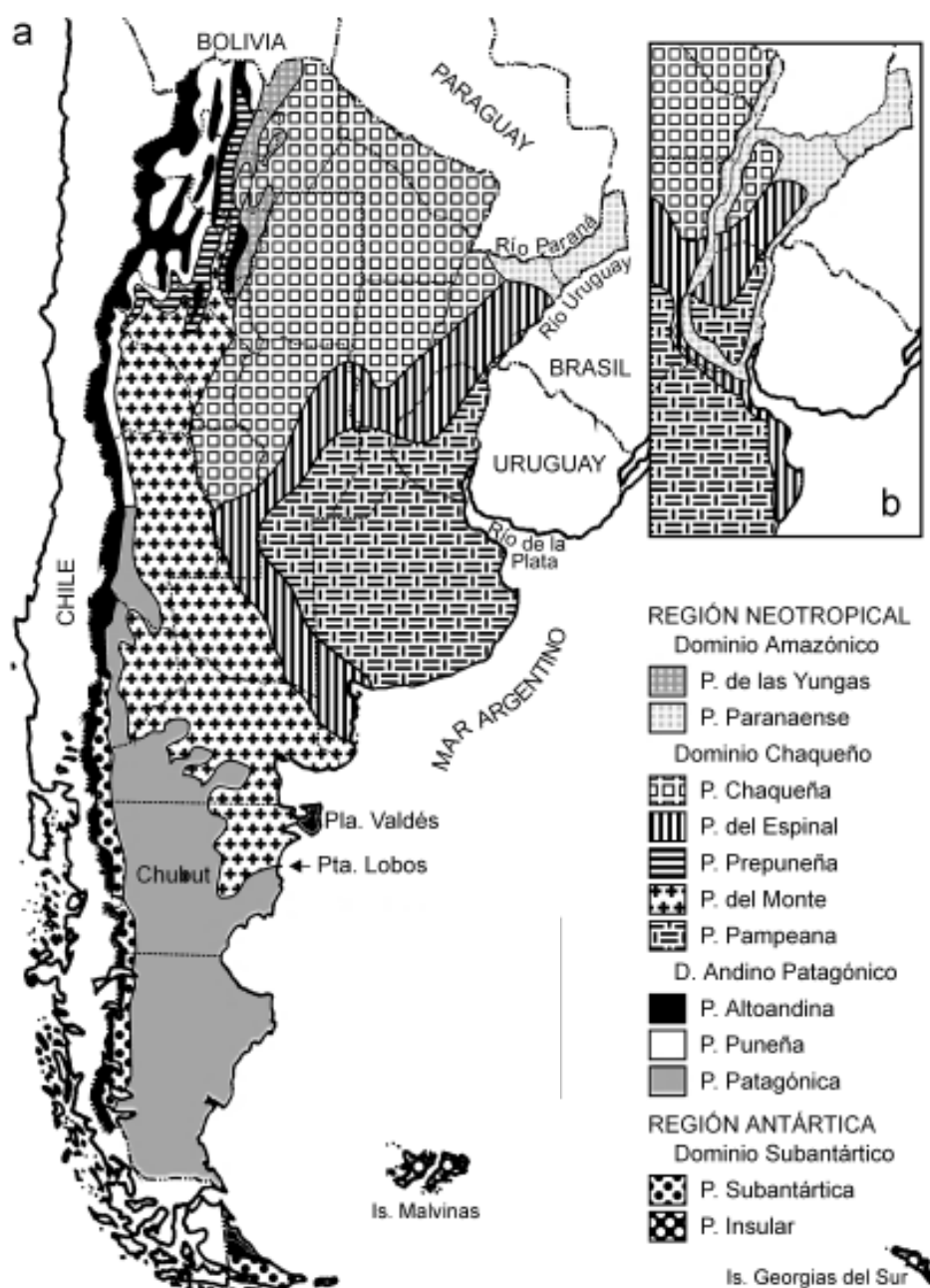
### **LAS SIMAROUBACEAE NATIVAS ARGENTINAS**

En Argentina las Simaroubaceae están representadas por 7 géneros y 9 especies: una especie introducida *Ailanthus altissima* (Mill) Swingle y siete nativas, *Castela coccinea* Griseb., *Castela tweedii* Planch., *Picrasma crenata*. (Vell.) Engl., *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl., *Picramnia sellowii* Planch., y *Simaba glabra* Engl. (Xifreda y Seo, 2006).

Las ocho especies nativas se distribuyen fundamentalmente entre dos Dominios Fitogeográficos: el Dominio Amazónico y el Dominio Chaqueño (Cabrera, 1971). El Dominio Amazónico constituye un enorme territorio cubierto de selvas tropicales y subtropicales, bosques y sabanas. Ocupa toda la cuenca amazónica y la mayor parte de la cuenca del Paraná. En nuestro país ocupa una superficie reducida que comprende dos provincias fitogeográficas: la provincia de la Yunga y la Paranaense (Fig. 1). El clima es cálido y húmedo, con precipitaciones principalmente estivales, que varían anualmente de 900 a 2500 mm según las localidades y temperaturas medias entre 14° y 26 °C.

El Dominio Chaqueño cubre la mayor parte de la República Argentina, extendiéndose prácticamente desde el Atlántico hasta la Cordillera, y desde el límite con Paraguay y Bolivia

hasta el norte de Chubut. Su vegetación es variada: bosques xerófilos caducifolios, estepas arbustivas, sabanas y praderas. El clima es variado, predominando el tipo continental, con lluvias moderadas a escasas, inviernos moderados y veranos cálidos. Este dominio comprende 5 provincias fitogeográficas: La provincia Chaqueña, del Espinal, Prepuneña, del Monte y Pampeana (Fig.1) (Cabrera, 1971).



**Figura 1:** Clasificación cartográfica de las provincias Fitogeográficas Argentinas según Cabrera (1971). **a:** Versión de regiones Fitogeográficas Argentinas (Cabrera, 1994). **b:** Versión previa de la fracción noreste.





**Figura 2:** Rama fructífera de *Ailanthus altissima*

### *Descripción del Género Ailanthus Desf.*

El género está representado por árboles generalmente dioicos, caducifolios, de hojas alternas, grandes y pinnaticompuestas. Las inflorescencias se disponen en panículas terminales, las de flores estaminadas con olor desagradable. Las flores son pequeñas, imperfectas, a veces perfectas, actinomorfas, con 5 o (6) sépalos imbricados, persistentes y 5 o (6) pétalos induplicados-valvares caducos. Los estambres son exertos, 10 a 12 en las flores masculinas, reducidos a 2 o 3 en las flores perfectas. El gineceo es dialicarpelar con 1 a 5 carpelos sobre el disco lobulado, con un óvulo central por carpelo. El fruto es un esquizocarpo de 5 sámaras con semilla central (Xifreda y Seo, 2006), (Fig. 2, imagen tomada de: <http://images.mobot.org/tropicosthumbnails/Tropicos/294/>).

En nuestro país sólo se encuentra una especie naturalizada: ***Ailanthus altissima* (Mill.) Single.**



**Figura 3:** Rama con infrutescencia de *Alvaradoa amorphoides*:

### *Descripción del Género Alvaradoa Liebm.*

Liebmann, *Vidensk. Meddel Dansk Naturhist. Foren. Kjobenhavn* 1853 (3-4): 100. 1853 (1854); etimol.: El nombre conmemora a Pedro de Alvarado, un miembro de la expedición realizada por Hernán Cortés en México. Arbustos o árboles pequeños o medianos, hasta 15m de altura; hojas imparipinadas, con 16-24 folíolos de 5 cm de largo o menores, oblongos, peciolulados, glabros en el haz y pilosos en el envés, de ápice emarginado u obtuso. Flores pequeñas, imperfectas, en general pentámeras, en racimos largos y delgados. Flor estaminada con 5 sépalos, 5 pétalos delgados alternisépalos, 5 estambres alternipétalos, insertos en la base del disco lobulado. Flor pistilada con 5 sépalos y gineceo tricarpelar, ovario inserto en la base de un disco, 2 carpelos estériles, el tercero fértil, unilocular con 2 óvulos basales. Sámara o aquenio inflado, con tres estilos persistentes (Fig. 3, imagen tomada de: <http://www.regionalconservation.org/images/PlantImages/Alvaamor>). Granos de polen pequeños, colpos cubiertos por una membrana con espínulas y exina muy delgada y tectada (Xifreda y Seo, 2006).

El género cuenta en nuestro país con una especie: ***Alvaradoa subovata* Cronquist.** (Brittonia 5 (2):134, 1944).



**Figura 4:** Rama florífera de *Castela erecta* subsp. *texana*

#### **Descripción del género *Castela* Turpin.**

Turpin, Ann. Mus. Natl. Hist. Nat. 7:78, t. 5 1806; etimol., en honor a R. N. Castel (1797), autor de poesías sobre plantas.

Arbustos o pequeños árboles con ramas espinescientes, dioicos, la corteza muy amarga. Hojas alternas, simples, ovadas, elípticas, brevemente pecioladas, coriáceas a cartáceas con el borde dentado. Inflorescencia: cimas paucifloras axilares o racimos pequeños. Flores pequeñas, perfectas, rojizas o verdosas. Sépalos 4, libres o soldados en la base, persistente en el fruto (Fig. 4, imagen tomada de: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/ornamentals/natives/shrubs/castelere4601>). Pétalos 4, libres, imbricados, más largos que los sépalos. Flores estaminadas con 8 estambres desiguales, insertos en la base de un disco 8-lobado, filamentos pilosos, engrosados o no hacia la base, apéndice estipular. Pistilodio ausente o rudimentario. Flores pistiladas con 8 estaminodios, 4 carpelar, unidos por los estilos, con estigmas libres y divergentes, con carpelos uniloculares y uniovulados. Disco hipógino carnoso, 8-lobulado. Estilo corto, con estigma 4-fido, a menudo de lóbulos circinados. Fruto esquizocárpico de mericarpios drupáceos, sobre un ginóforo poco engrosado. Grano de polen mediano, con la membrana del colpo lisa y exina del tipo reticulado (Xifreda y Seo, 2006).

Género con la presencia de dos especies en Argentina (Fabris, 1965; Pirani, 1987): ***Castela coccinea* Griseb.**, (*Abh. Konigl. Ges. Wiss. Gottingen* 19:107. 1874); y ***Castela tweedii* Planch.** (*London J. Bot.* 5:569. 1846).



**Figura 5:** Rama fructífera de *Picramnia pentandra*

#### **Descripción del género *Picramnia* Sw. non. cons.**

Swartz, *Prodr.*: 2, 27. 1788: Del griego *picros*= amargo, y *thamnos*= arbusto Nom. Cons.

Arbustos a subarbustos de porte medio, en general dioicos. Hojas alternas, pari o imparipinadas, con folíolos alternos a opuestos, generalmente asimétricos. Inflorescencia: pseudoespigas o racimos simples o reunidos en panículas, con brácteas diminutas, terminales o axilares. Flores pequeñas,

verduscas a amarillentas o purpúreas, imperfectas. Sépalos 3 a 5 imbricados, parcialmente unidos, persistentes en el fruto. Pétalos 3 a 5 de prefloración imbricada, lineares u oboval-espátulados, valvares; rara vez ausentes. Estambres 3 a 5, oposipétalos, insertos en la base de un disco 3 a 5 lobados en las flores pistiladas. Ovario dialicarpelar con 2 a 3 carpelos, 2 a 3 locular, con un disco basal 3 a 5 lobulado, estilo corto, con 2 o 3 estigmas bilobado, persistentes en el fruto, con 2 óvulos subapicales en cada lóculo; ovario reducido a un pistilodio pequeño en la flor estaminada. Fruto: baya 1-2 locular, de color vistoso, generalmente con 1 o 2 semillas (Fig. 5, imagen tomada de: <http://collections.mnh.si.edu/media/?i=10361045&w=1000>). Semillas sin endosperma. Granos de polen pequeños, colpos con membrana granulada y exina delgada, con la exina de tipo estriada (Xifreda y Seo, 2006).

En Argentina viven 2 especies nativas (Pirani, 1987): ***Picramnia parvifolia* Engl.**, (en Martius, *Fl. Bras.* 12(2): 242, pl. 49. 1874) y ***Picramnia sellowii* Planch.**, (*London J. Bot.* 5: 578. 1846).



**Figura 6:** Inflorescencia de *Picrasma quassioides*

#### Descripción del género *Picrasma* Blume.

Blume, *Bijdr. Fl. Ned. Ind.*: 247, 1825; etimol.: del griego “*picrasmos*”, alude al sabor amargo de la madera.

Árboles o arbustos de corteza con principios amargos.

Hojas alternas, imparipinadas, con folíolos opuestos, de borde entero o dentado. Inflorescencias cimas

compuestas redondeadas, axilares, sin brácteas. Flores pequeñas, verduscas, imperfectas (Fig. 6, imagen tomada de:

<http://images.mobot.org/tropicosthumbnails/TropicosImages2/100264000/>). Sépalos 4-5,

imbricados. Pétalos 4-5, más grandes que los sépalos, valvares. Flores estaminadas con 4-5 estambres alternipétalos, insertos en la base de un disco 4-5 lobulado, filamentos pilosos.

Flores pistiladas con 4-5 estaminodios cortos; carpelos 2-5 sobre ginóforo anular, unidos por los estilos, con estigmas libres, con un óvulo basal en cada carpelo. Fruto drupa con 1-5 carpidios. Grano de polen mediano, membrana del colpo lisa y exina reticulada.

En la Argentina se encuentra una especie. (Pirani, 1987; Xifreda y Seo, 2006): ***Picrasma crenata* (Vell.) Engl., Engl. u. Prantl.** (*Nat. Pflanzenfam.* 3 (4): 222. 1896).





**Figura 7:** Rama con inflorescencias de *Simaba cedron*

### *Descripción del género Simaba Aubl.*

Aublet, Hist. Pl. Guiane 1:400, t. 1775; etimol.: nombre dado a estas plantas en Guyana.

Árboles, arbustos o subarbustos; con principios amargos en todos los órganos. Hojas alternas, pinaticompuestas, generalmente imparipinadas, rara

vez unifolioladas, folíolos opuestos a subopuestos o alternos. Inflorescencias en racimos o panículas terminales, generalmente largas (Fig.7, imagen tomada de: <http://images.mobot.org/tropicosthumbnails/TropicosImages2/294/MOA-03971>).

Flores perfectas, generalmente vistosas. Sépalos 4 o 5 parcialmente unidos. Pétalos 4 o 5, libres, más grandes que los sépalos, oblongos, valvares. Estambres diplostémonos, generalmente de dos tamaños; filamentos provistos de una parte de la base de un apéndice piloso. Gineceo sobre un ginóforo visible, 4 o 5 carpelos uniloculares, unidos por los estilos; un óvulo axial, péndulo, estigma capitado o lobado. Fruto drupa. Exina del grano de polen reticulada y homogénea.

En Argentina se ha citado una especie en base a una única colección (Xifreda y Seo, 2006): ***Simaba glabra* Engl.**, en Martius, Fl.Bras. 12 (2): 217, t.43. 1874.

Con respecto a *Simaba glabra*, Sleumer (1953) dice que “este género, según Molfino, consta de una única especie en Misiones que fue recogida una sola vez por Molfino mismo, y de la cual no he visto el material” y afirma que la especie no fue encontrada nuevamente en Misiones.

### **ANTECEDENTES DE LA FAMILIA SIMAROUBACEAE.**

Desde el punto de vista de la morfoanatomía de la familia son escasos los trabajos que aportan datos sobre los caracteres macroscópicos y aun menor, de los caracteres microscópicos de especies nativas argentinas de esta familia. Las obras clásicas de anatomía (Solereder, 1908 y Metcalfe y Chalk, 1972), informan caracteres anatómicos generales de las hojas, cortezas y maderas, comprendiendo la mayoría de los géneros de la familia. Basado en Engler (1931), Webber (1936) analizó de forma sistemática el leño de 58 especies representantes de la familia, describiendo caracteres macroscópicos y sobre todo microscópicos del leño de especies del género *Picramnia*, *Alvaradoa*, *Picrasma* y *Castela*, especies todas pertenecientes a climas tropicales y subtropicales. Asimismo, se incluye en dicha publicación una clave de maderas para identificar las diferentes subfamilias que integraban el grupo Simarubées, descripto inicialmente por Jadim (1901). Relativamente pocas maderas de Argentina han sido ilustradas micrográficamente, a pesar de las ventajas evidentes que ello representa para su reconocimiento. O'Donell (1937) realiza un estudio comparativo de la anatomía del leño de tres especies nativas argentinas: *A. subovata* (*A. amorphoide*), *P. palo*

*amargo* (*P. crenata*) y *C. coccinea* y considera que, a pesar de las diferencias climáticas con las regiones tropicales, se registran algunos caracteres anatómicos de índole general que concuerdan con los citados por Webber (1936) al analizar el leño de dichas especies pertenecientes a climas tropicales y subtropicales. Respecto a caracteres microscópicos de cortezas, sólo se circunscriben a la especie *A. altissima*, en base a las descripciones de Müller (1908). Por otra parte, Di Sapio y col., (1997) analizaron caracteres anatómicos de cortezas y leños de *A. altissima*, *Quassia amara* y *C. tweedii* a fin de contribuir al conocimiento y delimitación de las citadas especies. Con el propósito de facilitar la identificación rápida de maderas duras, Wheeler y col., (1986, 1989) generaron una base de datos con caracteres microscópicos de las mismas, incluyendo el género *Picramnia*, *Alvaradoa* y *Ailanthus*. En lo concerniente a hoja, Jadin (1901), Solereder (1908) y Metcalfe y Chalk (1972), describen características de los tricomas, nectarios extraflorales, canales secretores, entre otros, en diferentes géneros de *Simaroubaceae*. Existen numerosos trabajos que se ocupan del estudio anatómico y fisiológico de los nectarios florales y extraflorares, glándulas y tricomas glandulares de *A. altissima* (Bory y Maczulajty, 1978; Clair-Maczulajty y Boris, 1983, 1985; Kowarik y Säumel, 2007; Shi y col., 2011). Fernando y Quinn (1992) y Xifreda y Sanso (1998) estudiaron la anatomía del pericarpio y la morfología polínica de distintas especies representantes de la familia como aportes taxonómicos y sistemáticos que contribuyeron a la re-circunscripción de la familia. Por último, Arambarri y col. (2008) describen la anatomía foliar de árboles y arbustos de la provincia Biogeográfica Paranaense donde se encuentra *P. crenata*, de la región de las Yungas describieron las hojas de *A. subovata* (Arambarri y col. 2009), y de la región Chaqueña semiárida destacaron los caracteres xeromórficos de hojas de *C. coccinea* (Arambarri y col., 2011).

La carencia de estudios estructurales en relación al hábitat de estas especies hizo necesario la ampliación de las investigaciones morfo-anatómicas de los órganos vegetativos en relación a diferentes condiciones ambientales, basándonos en el concepto de que el fenotipo es una expresión de la interrelación entre genotipo y ambiente (Schlichting y Smith, 2002). Muchos caracteres morfológicos están claramente relacionados con las condiciones ambientales. Las variaciones morfoanatómicas en respuesta al ambiente se expresan mejor en la hoja, por lo que el espectro de variación de la anatomía foliar provee una indicación de la plasticidad ecológica de cada especie (Roth, 1984). Con respecto a la corteza, a pesar de la riqueza de características y peculiaridades que nos ofrece su anatomía, rara vez se la utiliza para consideraciones taxonómicas. Varios autores señalan la importancia de sistematizar su estudio tanto a nivel macro como microscópico, definiendo los elementos útiles para el reconocimiento de las especies (Garlant y col., 2002). El espesor de la corteza es un carácter propio de la especie y está altamente influenciado por los factores ambientales. El número de peridermis acumuladas en el ritidoma es indicativo de algunas condiciones del medio; cuando el vegetal requiere de una mayor protección ante condiciones extremas, se acumulan mayor

número de capas protectoras de súber, hasta un límite característico para cada especie (Roth, 1981; Trockenbrodt, 1994).

En los últimos años ha habido un aumento del interés por el estudio de la anatomía ecológica de la madera con el fin de entender posibles mecanismos evolutivos del xilema (Bailey y Tupper, 1918), y tendencias filogenéticas (Carlquist, 1975, 1980). Se han obtenidos resultados prometedores mediante la comparación de la incidencia de varias características anatómicas de la madera en floras leñosas, o diferentes tipos de vegetación desarrolladas en diferentes medios ecológicos, a través del análisis de los patrones de variación dentro de géneros o familias con una gran amplitud ecológica (Weber 1936; Carlquist, 1975, 1977; Baas, 1976, 1982). Según Bass y col. (1983), en todos estos estudios se ha supuesto tácitamente que la mayor parte de las variaciones de las tendencias ecológicas observadas se fijan genéticamente, y que las mismas son el resultado de la selección. Por otro lado, la plasticidad fenotípica es un gran componente de las características anatómicas de la madera, y puede contribuir a las tendencias ecológicas observadas. Por tales motivos, se han realizado diferentes estudios anatómicos estructurales de maderas priorizando el análisis del efecto de algunos parámetros ecológicos como humedad, temperatura, estacionalidad, altitud y distribución geográfica sobre caracteres anatómicos cuantitativos como diámetro de poros, frecuencia de vasos, grado de agrupamiento de los vasos, longitud de elementos vasculares y tamaño de punteaduras intervasculares. También se ha hecho énfasis en la presencia de engrosamientos y tipos de placas de perforación, así como de un sistema de conducción subsidiario representado por elementos traqueales imperforados (Lindorf, 1994). Las tendencias ecológicas han sido interpretadas como el resultado de adaptaciones funcionales a factores ambientales y al considerar el transporte de agua como una de las principales funciones del xilema (Zhang y col., 1992), es lógico esperar que los estudios ecoanatómicos estén orientados hacia aspectos relacionados con los elementos de conducción. Los estudios ecoanatómicos han buscado conocer cómo varían algunos elementos xilemáticos ante cambios en las condiciones del medio donde crece la planta (Baas, 1976; Baas y col., 1983; Baas y Carlquist 1985; Carlquist y Hoekman 1985; Zhang y col., 1992; Villagra y Roig, 1997; Moglia y López, 2001). Lindorf (1994, 1997) y León (2001), entre otros, tomaron como elemento básico de análisis los índices de vulnerabilidad y mesomorfía propuestos por Carlquist (1977), con los cuales se busca determinar el grado de seguridad o eficiencia que presentan los elementos de conducción que se desarrollan en un medio determinado.

No existen hasta el momento trabajos que abarquen en forma integral el conocimiento sobre los caracteres ecoanatómicos de los órganos vegetativos, (hoja, pecíolo, tallo, leño, corteza) de ninguna de las especies propuestas para el estudio de la presente tesis. Se especula aportar nuevos datos anatómicos que avalen los nuevos reordenamientos taxonómicos propuestos para esta familia por Cronquist (1944;), Fernando y Quinn, (1992,



1995), y en relación al último sistema de clasificación APGIII (Haston y col., 2009). Las hojas, y principalmente las cortezas y maderas, de las especies de la flora de Argentina han sido poco estudiadas desde el punto de vista micrográfico, por tal motivo, el estudio exo y endomorfológico brindará aportes para la futura elaboración de farmacopeas herbarias locales que brindarán un conocimiento avalado en forma científica de las especies utilizadas en medicina popular y que facilitarán el control de calidad de las mismas, teniendo en cuenta que el análisis micrográfico de las especies biológicamente activas, es requisito indispensable en las Farmacopeas Herbarias.

### USOS MEDICINALES DE LA FAMILIA.

La familia Simaroubaceae fue la fuente de medicinas antimaláricas del nuevo mundo, *Quassia amara*, su más conocida representante, fue descubierta en 1730 en Surinam por un esclavo llamado Kwasi quien trataba casos de fiebre intermitentes con decocciones de la corteza de estas plantas. En reconocimiento a este descubrimiento y a su descubridor, Linneo le dio a dicha planta el nombre científico *Q. amara* (que significa quassia amarga). De hecho, *Q. amara* es una de las especies amazónicas con mayor reputación antimalárica, tanto en tratamientos preventivos como de curación (Vigneron y col., 2005). En América central y el norte de Suramérica, la madera y la corteza de *Q. amara* se consumen en forma de tónico amargo digestivo, contra la diarrea y para contrarrestar las fiebres maláricas (Ocampo y Maffioli, 1987; Martínez, 1992, Ocampo, 1995). El leño y corteza de *Q. amara* han sido utilizados además, como tónico estomacal, como emético, para el tratamiento de fiebres, antihelmíntico (Barbetti y col., 1987) e insecticida (Lewis y Lewis, 1977; Ninci, 1991).

Desde entonces, las Simaroubaceae en general, han sido utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de amebiasis, disentería, parásitos intestinales, para combatir fiebres intermitentes (Chan y col., 1986; Dou y col., 1996b; Cabral y col., 1993; Bertani y col., 2007) y como insecticidas (Curcino-Vieira y Braz-Filho, 2006); así, especies del género *Ailanthus* son utilizadas en la medicina popular China para el tratamiento de resfríos y enfermedades gástricas (De Feo y col., 2003) y especies del género *Brucea* contra disentería, malaria y cáncer (Kim y col., 2003). En México, especies del género *Castela* son utilizadas popularmente para el tratamiento de enfermedades del hígado, para aliviar dolores estomacales y como antiespasmódicas (Kubo y col., 1992). En la medicina tradicional Africana se utilizan decocciones de especies de *Hannoa* para tratar fiebres y trastornos gastrointestinales (Vanhaelen-Fastre y col., 1986); en Brasil, especies del género *Picrasma* son utilizadas tradicionalmente contra la *Diabetes mellitus*, trastornos gástricos e hipertensión (Novello y col.,

2003), mientras que en Asia e Indonesia se utilizan como febrífugas y como sustituto de la quinina (Koike y Ohmoto, 1990)

Las propiedades medicinales asociadas a estas plantas han sido atribuidas a la presencia de ciertos compuestos amargos denominados colectivamente “cuasinoides”. Los primeros estudios realizados sobre la actividad antimalárica de extractos de Simaroubaceae datan de 1947 (Spencer y col., 1947). Sin embargo, fue a partir del descubrimiento en los años setenta de la potente actividad antileucémica de la bruceantina, cuasinoide de 20 carbonos, que los estudios relacionados con las actividades biológicas de especies pertenecientes a la Familia Simaroubaceae han aumentado enormemente; así se ha reportado: actividad antileucémica (Kupchan y col., 1975; Fukamiya y col., 1992; Okano y col., 1985; Yoshimura y col., 1985), antitumoral (Geran y col., 1972; Tamura y col., 2003), citotoxicidad contra diversos carcinomas humanos (Fukamiya y col., 1992), antimalárica (Dou y col., 1996b; Chan y col., 1989; Muhammad y col., 2004), anti alimentaria (Polonsky y col., 1989; Daido y col., 1995) e insecticida (Kubo y col., 1992), herbicida y herbi-estática (Heisey, 1990; Heisey y Heisey, 2003; Jiwajinda y col., 2001) antiparasitaria y nematicida (Watanabe y col., 2000; Jiwajinda y col., 2002).

### ***FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA SIMAROUBACEAE.***

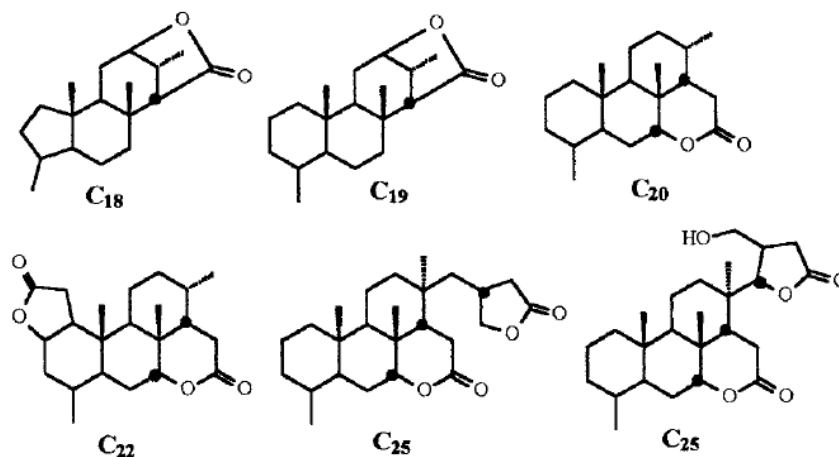
#### *Cuasinoides*

Químicamente, las Simaroubaceae están caracterizadas por la producción de compuestos amargos denominados colectivamente cuasinoides. Los cuasinoides son triterpenos degradados o lactonas altamente oxigenadas, con uno o más centros estereogénicos. Sus precursores biosintéticos son similares a los de los limonoides, son biosintetizados a través de la vía biogenética de los triterpenoides, a partir de triterpenos tetracíclicos (Polonsky, 1973; Curcino-Vieira y Braz-Filho, 2006). Estos principios amargos son exclusivos de esta familia y por lo tanto constituyen marcadores taxonómicos excepcionales (Clark, 1937; Dreyer, 1983; Bhatnagar y col., 1987; Simão, y col., 1991). Se han aislado e identificado, hasta el momento, más de 200 cuasinoides diferentes (Polonsky y col., 1985; Simão, y col., 1991; Guo y col., 2005).

Presentan 5 tipos de esqueletos básicos (Fig. 8):

- a- Esqueleto de 18 átomos de carbono (C18) denominado esqueleto lauricolactano (Fig.9).
- b- Esqueleto de 19 átomos de carbono (C19) denominado esqueleto cedrolidano (Fig.10 y 13).
- c- Esqueleto de 20 átomos de carbono (C20) denominado esqueleto quasolidano. (Fig.11 y 12)

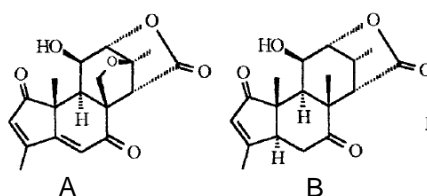
- d- Esqueleto de 22 carbonos (C22) denominado esqueleto picrolemniano
- e- Esqueleto de 25 átomos de carbono (C25) denominado esqueleto simarolidano.



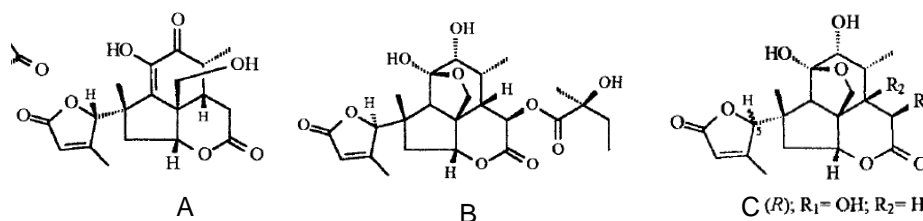
**Figura 8:** Esqueletos carbonados básicos de los cuasinoides.

Los de mayor ocurrencia son los de 20 átomos de carbono. Los cuasinoides de C20 poseen una función  $\delta$ -lactona, los de C19 y C18 una  $\gamma$ -lactona, y  $\delta$ -lactona y  $\gamma$ -lactona en los restantes (Fig.8), con grupos hidroxilos, hidroxilos esterificados, grupos carbonilos, metoxilos y carboximetoxilos.

Se han aislado quasinoideos O-glicosilados de especies de *Brucea* y *Picrasma* (Curcino-Vieira y Braz-Filho, 2006).

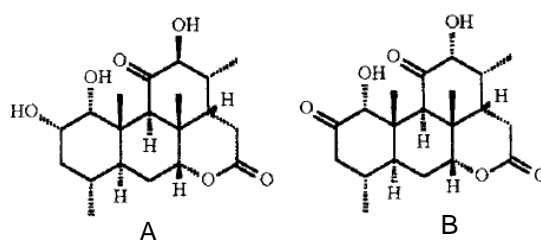


**Figura 9:** Cuasinoides de C18, **A:** Samaderina, aislado de *Samadera indica*; **B:** Eurycomalactona, aislado de *Eurycoma longifolia*.

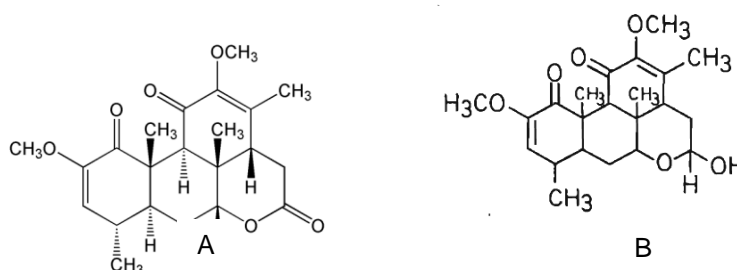


**Figura 10:** Cuasinoides de C19. **A:** (19): Shinjulactona y **B:** Ailantinal, aislados de *A. altissima*; **C:** Poliandrol, aislado de *C. poliandra*.

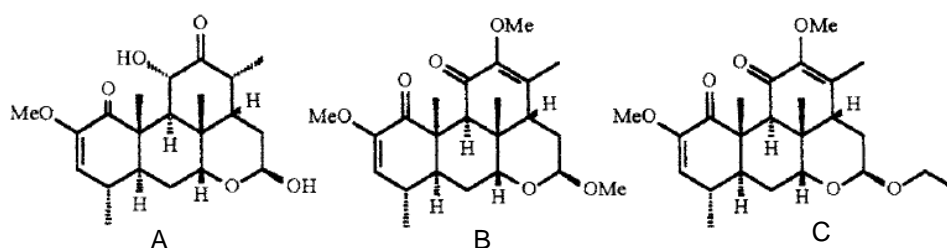




**Figura 11:** Cuasinoides de C20, **A:** Castelanina, **B:** Chaparrina; aislados de *C. tortuosa*.



**Figura 12:** Cuasinoides de C 20, **A:** Cuasina, **B:** Neocuasina, aislados de *Q. amara*.

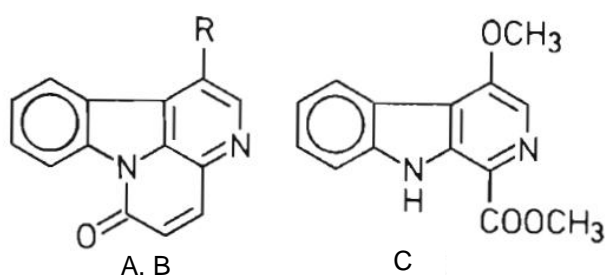


**Figura 13:** Cuasinoides de C19, tipo cuasina. **A:** β-dihidronor neocuasina, **B:** 16-β-O-metilneocuasina y **C:** 16-β-3-O-etilneocuasina, aislados de *P. crenata*.

### Alcaloides

Realmente no existe una definición sencilla del término alcaloide puesto que no existe una delimitación clara entre alcaloides y aminas complejas de origen natural. Los alcaloides típicos derivan de plantas, contienen uno o más átomos de nitrógeno, generalmente formando parte de un anillo heterocíclico, son de naturaleza básica y se encuentran normalmente en estado de sales. Biogenéticamente derivan de aminoácidos y generalmente poseen algún tipo de acción fisiológica sobre el hombre y los animales. Hasta el momento se han aislado e identificados unos 10.000 alcaloides de fuentes naturales.

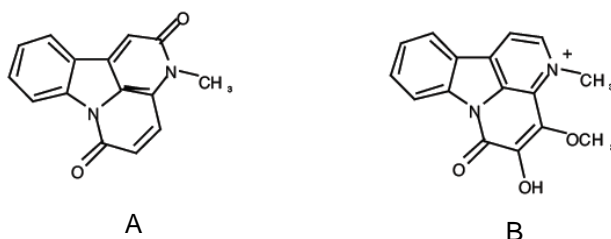
De distintas especies de la familia Simaroubaceae se han aislado e identificado alcaloides del tipo indólicos. Se encontraron de dos tipos, ambos derivados del triptófano: las cantinonas y los β-carbonílicos (Fig. 14).



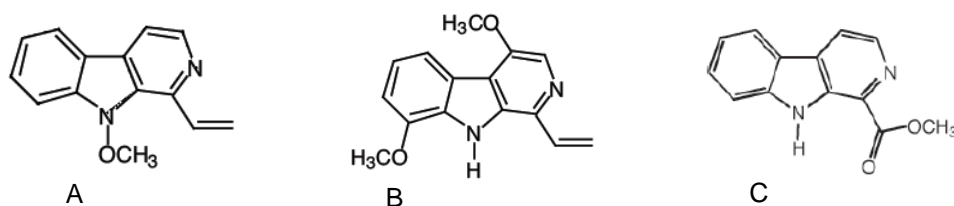
**Figura 14:** Alcaloides indólicos de Simaroubaceae. **A:** Cantin-6-ona, R=H; **B:** 1-metoxicantin-6-ona, R=OCH<sub>3</sub>; **C:** Metil 4-metoxi-β-carbolina-1-carboxilato.

Dentro del primer grupo, de la cantinona (3-metilcantin-2,6-diona), se encuentra reportado el aislamiento de al menos 5 alcaloides de *Q. amara* (Barbetti y col. 1993, Barbetti y col., 1987, Barbetti y col., 1990, Njar y col., 1993) de *A. altissima* (Varga y col., 1980), de *Leitneria floridana* (Readel y col., 2003) y de *Eurycoma harmadiana* (Kanchanapoom y col., 2001) (Fig. 15).

El segundo grupo consta de derivados de la β-carbolina: 1-vinil-4,8-dimetoxi-β-carbolina, 1-metoxicarbonil-β-carbolina y N-metoxi-1-vinil-β-carbolina, entre otros, fueron aislados de *Q. amara* (Barbetti y col. 1987, Furlan y col.1994) *P. crenata* (Sanchez y Comin, 1971) *Eurycoma harmadiana* (Kanchanapoom y col., 2001) y *A. altissima* (Varga y col., 1980) (Fig. 16).



**Figura15:** Alcaloides del tipo cantinona; **A:** 3-metilcantin-2,6-diona; **B:** 5-hidroxi-3-metil-4-metoxicantin-2,6-diona.



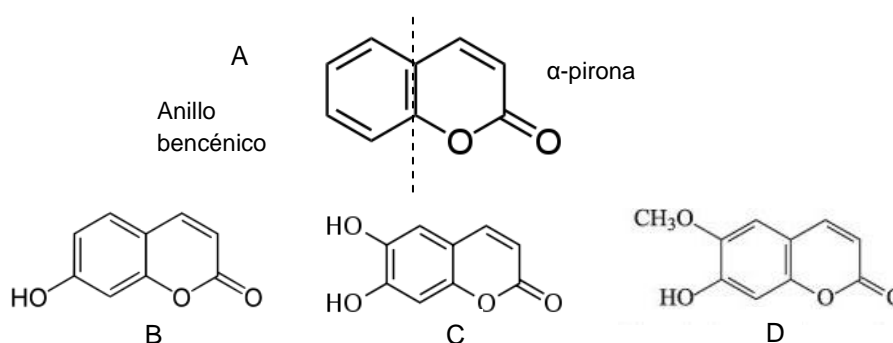
**Figura 16:** Alcaloides del tipo β-carbónicos. **A:** N-metoxi-1-vinil-β-carbolina; **B:** 1-vinil-4,8-dimetoxi-β-carbolina; **C:** 1-metoxi-β-carbolina.

## Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos probablemente constituyan el mayor grupo de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y forman parte de la mayoría de los compuestos que poseen estructuras aromáticas, que van desde estructuras simples con un anillo aromático hasta sustancias poliméricas muy complejas como los taninos y lignanos. Generalmente, el origen biosintético de estos compuestos involucra la vía del ácido shikímico, aunque algunos fenoles pueden poseer anillos aromáticos derivados de la condensación del acetato. Los compuestos fenólicos de interés farmacéutico incluyen: compuestos fenólicos simples, taninos, cumarinas, antraquinonas, flavonas y glicósidos flavonoides, antocianidinas y lignanos. A continuación, sólo se describirán los compuestos fenólicos que han sido aislados o reportados para especies de la Familia Simaroubaceae: cumarinas y flavonoides.

### Cumarinas

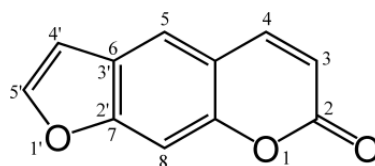
Las cumarinas son benzo 2-pironas o lactonas de los ácidos orto- hidroxí-cinámicos, sus estructuras son muy variables, se conocen más de 800 en los vegetales superiores (Bruneton y Barton, 1991). De ellas, las más sencillas, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal. Aparte de algunos casos raros, como la cumarina, todas las cumarinas conocidas se encuentran sustituidas en el C<sub>7</sub> por un hidroxilo. Esta sustitución en el anillo bencénico por hidroxilos, puede ser doble (C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>) o incluso triple (C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub>).



**Figura 17:** **A:** Estructura básica de las cumarinas: 1,2-benzopirona; Cumarinas simples: **B:** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= H, R<sub>2</sub>= OH: Umbeliferona; **C:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H: Esculetina; **D:** R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H: Escopoletina.

Se las clasifica en dos grandes grupos: Cumarinas simples, que derivan de los ácidos cinámicos, y pueden encontrarse en forma de glicósidos (Fig. 17); y Furano-cumarinas, que poseen un ciclo suplementario que implica la alquilación del núcleo aromático en C<sub>6</sub> (Fig.18).

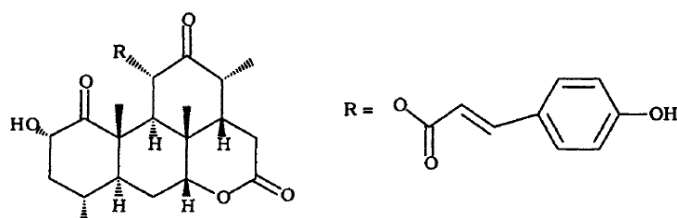




**Figura 18:** Estructura básica de Furano-cumarinas.

Una propiedad interesante de las cumarinas es su fluorescencia bajo luz ultravioleta. Aunque dicha fluorescencia no constituye una característica única o distintiva de este grupo de compuestos químicos, puede ser considerada de valor diagnóstico cuando se la utiliza correctamente (Soine, 1964). La mayoría de las cumarinas fluorescen de color azul bajo luz UV. Hay que diferenciar las cumarinas de las cromonas simples, éstas presentan fuertes absorciones entre 240 y 250 nm, mientras que las cumarinas simples absorben a 274 y 311 nm debido a los anillos bencénicos y  $\alpha$  pirona respectivamente y presentan variaciones según sus sustituyentes. Las sustituciones oxigenadas en C-7 causan un efecto batocrómico en la banda de la  $\alpha$  pirona (Murray y col., 1982).

Jacobs y col. (2007) y Kanchanapoom y col. (2001) reportaron el aislamiento de escopoletina en *Castela macrophylla* y *Eurycoma harmadiana* respectivamente. El primer “cumaroil-cuasinoide” aislado de fuentes naturales, el 11-O-trans-p-cumaroilamarolido (Fig.19) fue aislado de una Simaroubaceae (Dou y col., 1996a).

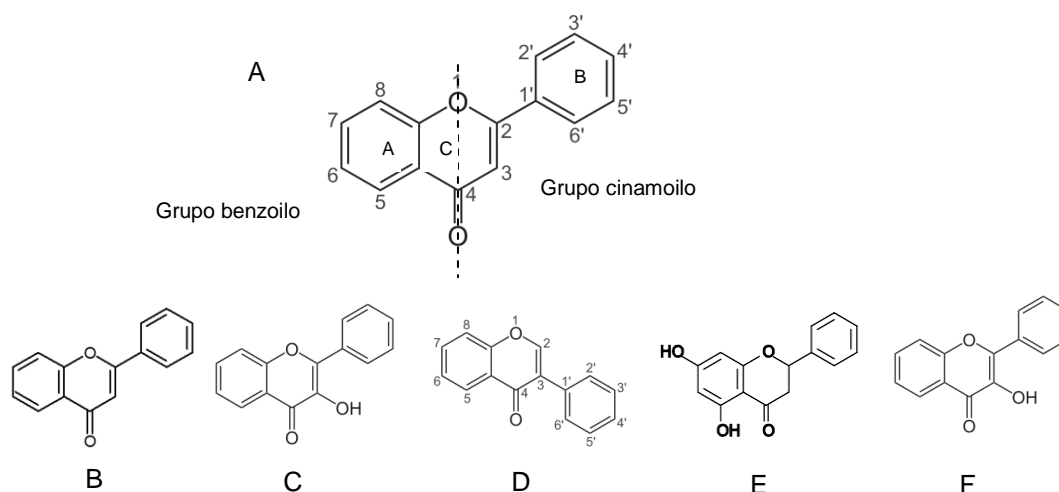


**Figura 19:** Cumaroil cuasinoide: 11-O-trans-p-cumaroilamarolido

### Flavonoides

Los flavonoides, metabolitos secundarios fenólicos de las plantas por excelencia, son en su mayoría los pigmentos responsables de la coloración de las flores y de algunos frutos. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, generalmente en forma soluble como heterósidos. Se acumulan en vacuolas de distintos tejidos vegetales donde cumplen funciones regulatorias y protectoras. Actúan como comunicadores planta-ambiente al ser reconocidos por polinizadores debido a su color y olor (Harborne y Williams, 2000). Poseen la fórmula química básica  $C_6-C_3-C_6$ , y un núcleo básico: el 2-fenil cromano (Fig. 20A). De acuerdo al grado de oxigenación del C-3, se los clasifica como flavonas (Fig. 20B), flavonoles (Fig. 20C), isoflavonas (Fig. 20D), flavanonas (Fig. 20E) y dihidroxiflavonoles (Fig. 20F). La presencia de

dobles enlaces conjugados en su molécula hace que emitan fluorescencia brillante cuando son excitados por la luz UV. Los espectros UV de la mayoría de los flavonoides consisten de dos máximos de absorción, uno que aparece en el rango de los 240-285 nm (Banda II) y otro en el rango entre los 300 y 400 nm (Banda I). En general se considera que, la absorción de la banda II corresponde a la absorción del sistema benzoilo del anillo A, y la banda I al sistema cinamoilo del anillo B (Fig. 20A) (Harborne y Mabry, 1982). Las flavonas absorben entre los 304 y 350 nm mientras que los flavonoles lo hacen entre los 352 y 385 nm., por lo tanto, la posición del pico de absorción correspondiente a la banda I provee una idea de qué tipo de flavonoide se trata. Más aún, las flavonas y flavonoles altamente oxigenados tienden a absorber a mayores longitudes de onda que aquellas con pocos sustituyentes oxígeno. Por otro lado, la banda II se ve significativamente afectada por los cambios en el patrón de oxigenación del anillo A, y sufre corrimientos que van desde los 250 nm para la flavona, a los 252 nm en la 7-hidroxiflavona y hasta los 282 nm en la trihidroxiflavonas. La metilación o glicosilación del núcleo flavonoide en posición 3-, 5 y 4' resulta en corrimientos hipsocrómicos, principalmente de la banda I (Harborne y col., 1975).



**Figura 20:** A: Estructura básica de los flavonoides, núcleo 2-fenil-cromano; Estructuras básicas de: B: Flavonas; C: Flavonoles; D: Isoflavonas; E: Flavanonas; F: Dihidroxiflavanonas.

Debido a su capacidad de inhibir enzimas específicas, estimular hormonas y neurotransmisores y secuestrar especies reactivas del oxígeno (Havsteen, 2002) exhiben una amplia gama de efectos biológicos, entre las que se incluyen acciones antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras (Wenzel y col., 2000; Kim y col., 2004). Los flavonoides han demostrado ser eficientes secuestradores de ERO, por ejemplo, del anión superóxido, del radical hidroxilo o peróxido. También pueden actuar como secuestradores de oxígeno singlete (Harbone y Williams, 2000). Se ha probado la capacidad como agentes hepatoprotectores de varios flavonoides (Middleton y Kandaswarmi, 1994) así como también su

acción contra la disentería, como antidiarreicos y contra diversas enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso (Galvez y col., 1993).

## *EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS*

### *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.*

A pesar de que las plantas medicinales son raramente utilizadas como antioxidantes en la medicina tradicional, sus propiedades terapéuticas podrían deberse, en parte, a la presencia de compuestos secuestradores de radicales libres.

El oxígeno es un elemento esencial para los organismos aeróbicos, es el aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, la cual es la principal fuente de energía en estos organismos. Sin embargo, en determinadas condiciones puede resultar tóxico (Martínez-Cayuela, 1995). El oxígeno puede ser parcialmente reducido durante el metabolismo normal o en respuestas inflamatorias generando moléculas reactivas denominadas Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). La producción de las mismas también puede darse como consecuencia de la exposición (endógena o exógena) a una gran variedad de químicos.

Estas ERO pueden contener un número impar de electrones como los radicales libres: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ) y otros. Las Especies Reactivas del Nitrógeno como el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) también tienen número impar de electrones. En contraste, algunas ERO pueden contener un número par de electrones como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxido lipídico ( $ROOH$ ) (Halliwell, 1997; Prior y col., 2000). Las ERO son electrofílicas y atacarán centros nucleofílicos en las células causando: la oxidación de ácidos grasos (lipoperoxidación), una reacción autocatalítica que lleva al deterioro de las membranas celulares y cuyos productos finales (aldehídos, cetonas, etano, pentano, entre otros) contribuyen al efecto tóxico producido; la oxidación de proteínas y lo más importante, daño al ADN (Halliwell, 1997; Desmarchelier y col., 1999).

Afortunadamente las células poseen sistemas de defensa para neutralizar la toxicidad de las ERO. Estos pueden ser antioxidantes endógenos o enzimáticos que incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP) y glutatión reductasa (GR), así como antioxidantes de alto peso molecular, como albúmina y ferritina, y de bajo peso molecular, como glutatión (GSH) y ácido úrico. Los antioxidantes exógenos ingresan al organismo a través de los alimentos, como por ejemplo las vitaminas E y C y el  $\beta$ -caroteno. Algunos metales como selenio, cobre, zinc y magnesio (en ocasiones forman parte de las enzimas antioxidantes) también son fundamentales en esta protección celular (Desmarchelier y col., 1999; Issa y col., 2006)

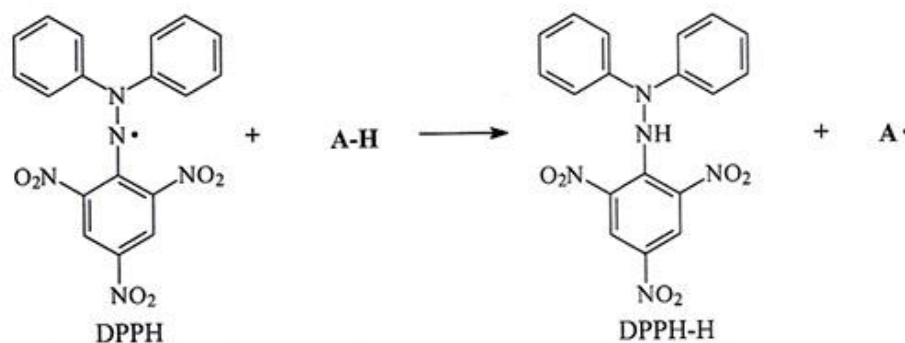
El estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre la velocidad de generación y detoxificación de ERO, que lleva a una sobreproducción de éstas.

En los últimos años se ha acumulado evidencia que sugiere la existencia de una relación entre el estrés oxidativo y el origen de numerosas enfermedades. Por ejemplo las células fagocíticas del sistema inmune producen grandes cantidades de radicales libres como parte del mecanismo que les permite destruir los agentes extraños. Si bien esto constituye una defensa contra la infección, hay enfermedades (como la artritis reumatoidea) que se producen por exceso de activación fagocitaria y el consecuente daño a los tejidos (Desmarchelier y col., 1999).

Además el estrés oxidativo puede causar envejecimiento y ciertas enfermedades degenerativas humanas incluyendo, cáncer (Halliwell, 2007), enfermedades cardiovasculares (Virgili y col., 2001; Johnson, 2001), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedades del sistema inmune y demencia senil (Thériault y col., 2006). Asimismo se presume que puede estar relacionado con el desarrollo de Diabetes Mellitus, hipertensión, enfermedades inflamatorias, lesiones neoplásicas, leucemia (Cieřlik y col., 2006) y diversas enfermedades del tracto gastrointestinal (Desmarchelier y col., 1999). Los radicales libres del oxígeno están involucrados en la patogénesis de lesiones isquémicas en la mucosa del intestino, por lo tanto los compuestos antioxidantes juegan un rol preponderante en el tratamiento de las lesiones intestinales generadas por isquemias (Sasaki y Joh, 2007). Con estos antecedentes, la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales de origen vegetal, o de extractos vegetales con actividad antioxidante se ha convertido en una alternativa interesante para numerosos equipos de investigación (Moure y col., 2000).

Existen distintos métodos para determinar la capacidad depuradora de radicales libres de un compuesto o de un extracto (Hayashi y col., 1988, Roback y Gryglewski, 1988), entre ellos la reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es una de las más utilizadas (Shimada y col., 1992; Brand-Williams y col., 1995; Molyneux, 2004). El radical DPPH es ampliamente utilizado para testear la habilidad de los compuestos para actuar como depuradores de radicales libres o dadores de hidrógeno, y por tanto, para evaluar la capacidad antioxidante de sistemas biológicos complejos. El método del DPPH puede ser utilizado con muestras líquidas y sólidas y no es específico para un tipo de compuesto antioxidante en particular, sino que se aplica para conocer la capacidad depuradora total de un determinado sistema. (Prakash y col., 2001). El mencionado radical es depurado por antioxidantes por donación de un hidrógeno para formar la forma reducida estable de la molécula. Los radicales antioxidantes formados son estabilizados por la formación de productos no-radicales (Fig.21).





**Figura 21:** Reducción del radical DPPH.

El radical DPPH es de color violeta y presenta un máximo de absorción a 515 nm ( $\epsilon_{515\text{nm}} = 1,09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La absorbancia a 515 nm disminuye a medida que el color vira al amarillo debido a la aparición de la forma reducida, en presencia de un secuestrador de radicales libres.

### ACTIVIDAD TRIPANOCIDA

Existe probada evidencia de la actividad antimalárica por parte de extractos y/o compuestos aislados de distintas especies de Simaroubaceae (Dou y col., 1996a; Chan y col., 1989; Muhammad y col., 2004); Bourdy y col., (2004) demostraron que los extractos de hojas de *C. coccinea* tenían una fuerte actividad contra *Plasmodium falciparum*, el agente causante



**Figura 22:** *Triatoma infestans*, "vinchuca"

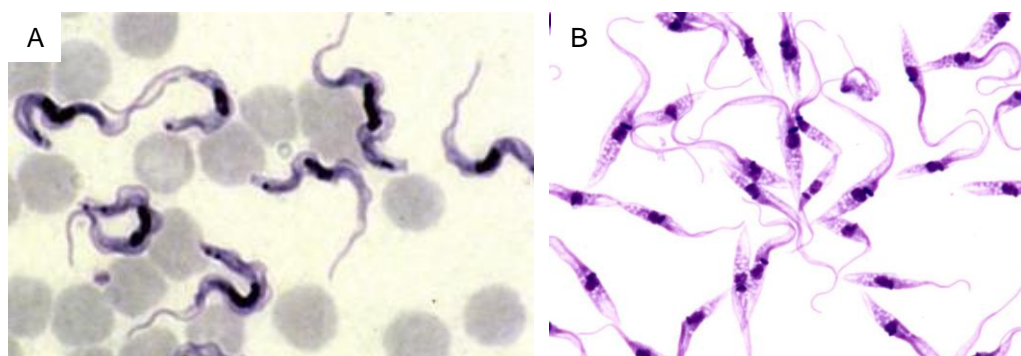
de la malaria. Si bien la malaria posee baja incidencia en nuestro país, esta zona es endémica para el Mal de Chagas, otra enfermedad de origen parasitario causada por el *Trypanosoma cruzi*.

El Mal de Chagas o tripanosomiasis americana fue descubierta por el Dr. Carlos Chagas (1909), quien identificó por primera vez al parásito causante de la enfermedad: *Trypanosoma cruzi*, y a su vector: *Triatoma infestans* (Fig. 22, imagen tomada de: <http://chagas.crilar-conicet.gob.ar>).

A nivel mundial, se calcula que existen unos 10 millones de personas infectadas, principalmente en América Latina. Más de 25 millones de personas están a riesgo de adquirir la enfermedad. Se calcula que en 2008 esta enfermedad mató a más de 10.000 personas. Inicialmente, la enfermedad de Chagas estaba confinada a la Región de las Américas, principalmente en América Latina, pero en la actualidad se ha propagado a otros continentes (OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>, 2012). La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas: inicialmente la fase aguda, dura unos dos meses después de contraerse la infección; durante esta fase aguda circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves. En menos del 50% de las personas picadas por un triatomíneo (vinchuca), un signo inicial

característico puede ser una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado. Durante la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>, 2012).

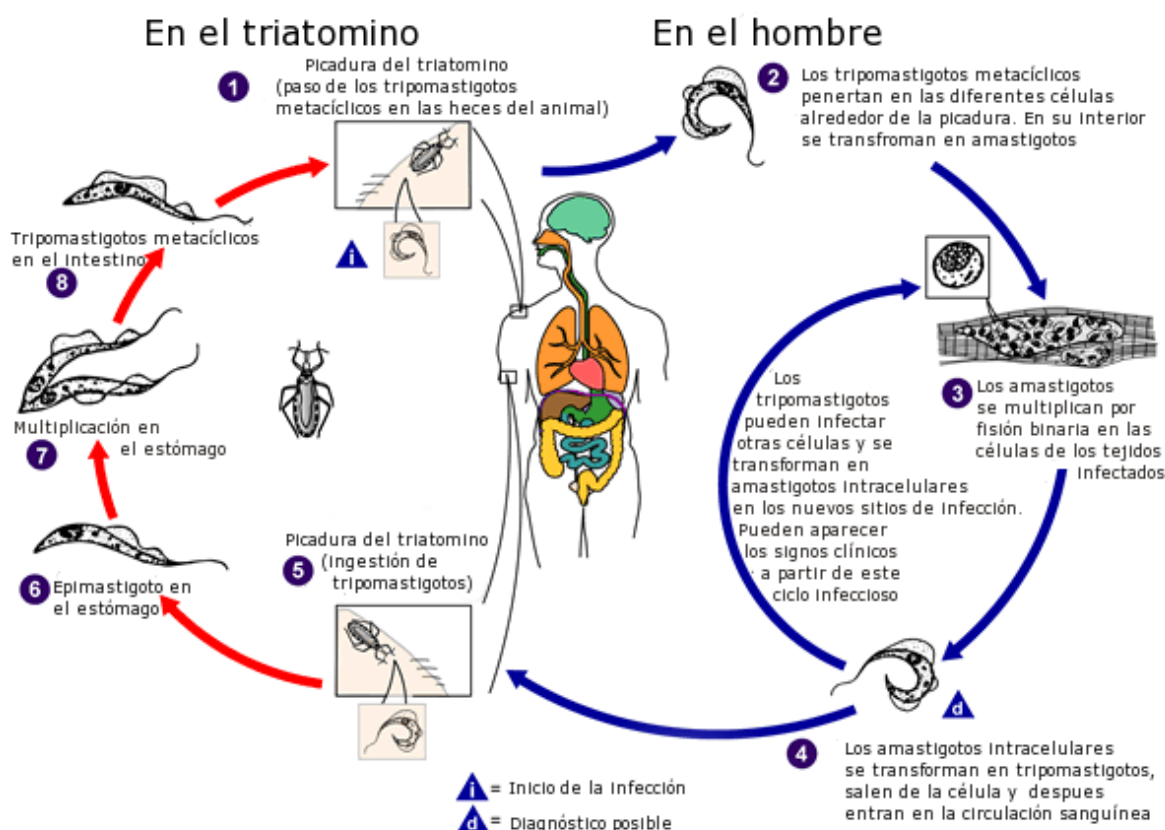
El parásito *T. cruzi* se transmite principalmente por las heces infectadas de *T. infestans* que se alimenta de sangre. Por lo general, éstos viven en las grietas y huecos de las casas mal construidas en las zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana. En general, pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, y defecan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta.



**Figura 23:** *T. cruzi*. **A:** Forma sanguínea infectiva: tripomastigotes; **B:** Forma replicativa en el insecto: epimastigotes. Imágenes tomadas de: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

*T. cruzi* es un parásito intracelular perteneciente, al igual que *Plasmodium falciparum*, al orden de los Kinetoplastidos (por contener una organela llamada kinetoplasto que contienen ADN mitocondrial empaquetado). El parásito posee diferentes estadios morfológicos asociados a distintas etapas de su ciclo de vida (Fig. 23). La forma infectiva se denomina tripomastigote (Fig. 22A), es una forma flagelada que circula por el torrente sanguíneo del hospedador y penetran en sus células donde se transforma en amastigote. El amastigote carece de flagelo y se divide por fisión binaria en las células de los tejidos infectados. Después de la división se transforman nuevamente en tripomastigotes, se lisa la célula y estos son liberados al torrente sanguíneo pudiendo de esta forma infectar otros tejidos (Fig. 24). Dentro del intestino del *T. infestans*, la forma replicativa del parásito es el epimastigote (Fig. 22B), esta es una forma flagelada que se divide en el intestino medio del parásito y luego se transforma en la forma

infectiva: tripomastigote. Cuando el insecto se alimenta de la sangre del hospedador excreta esta forma infectiva que ingresa al organismo a través de la herida.



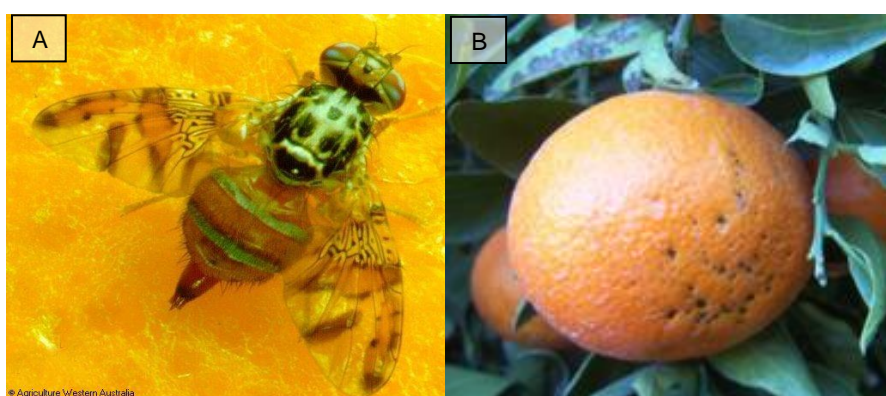
**Figura 24:** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Imagen tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

La terapia actual para la enfermedad se basa en dos drogas: el Benznidazol y el Nifurtimox, los cuales han probado ser muy efectivos durante la etapa aguda de la enfermedad. Sin embargo, su efectividad durante la etapa crónica es controvertida. Además, se han reportado graves efectos secundarios en aproximadamente el 50% de los pacientes tratados (Castro y col., 2006). Por tales motivos, existe una necesidad de desarrollo de nuevas drogas, más seguras y eficientes, así como también de nuevas políticas de control epidemiológico.

#### ACTIVIDAD INSECTICIDA.

Existen numerosos trabajos reportando la actividad insecticida y anti alimentaria de extractos de especies pertenecientes a la Familia Simaroubaceae (Polonsky y col., 1989; Okano y col., 2000; Rodríguez y col., 2011). El potencial insecticida de *Q. amara*, conocida vulgarmente como palo amargo, fue demostrado en 1884, en Inglaterra, en el control de áfidos y lepidópteros. Posteriormente sus extractos han sido ensayados como eficaces contra más de 50 plagas diferentes de ácaros, coleópteros, hemípteros, himenópteros, lepidópteros y thisanópteros (Leskinen y col., 1984; Mancebo y col., 2000, Alcalde y Del Pozo, 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, durante el transcurso de este trabajo de tesis se

evaluó la capacidad insecticida de los extractos de *Castela tweedii* sobre *Ceratitis capitata* Wied., llamada comúnmente “mosca del Mediterráneo” o “mosca de los frutos” (Fig. 25A), plaga de distribución mundial que, en nuestro país, es una de las más importantes del cultivo de frutales. Con un ciclo de vida corto, de fácil manipuleo y alta fecundidad, es adecuada para el ensayo biológico (Bado y col., 2004). Argentina ocupa el octavo lugar en el mundo en producción de frutas cítricas frescas y es el primer exportador mundial de limón (<http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2014.pdf>). El problema productivo es muy importante dado que estas moscas afectan al fruto terminado y una sola picadura produce la pérdida de la fruta (<http://www.asa.org.ar/educacion.asp>). Se conocen más de 200 especies de frutas y hortalizas hospedadoras de la mosca de la fruta en todo el mundo, siendo las más relevantes las especies del género *Citrus*, los frutales de carozo como *Prunus persica* (durazno), *Prunus armeniaca* (damasco) y *Prunus domestica* (ciruela) y hortícolas como *Lycopersicon esculentum* (tomate) y *Solanum melongena* (berenjena) (<http://www.cosave.org/pagina/listado-de-las-principales-plagas-reglamentadas-para-la-region-del-cosave>). Las pérdidas en la producción de frutas son del 15 al 20% en cítricos y superiores al 20% en frutales de carozo (Mareggiani y Pelicano, 2008). Los daños en los frutos son producidos por la inserción del ovíscapo de la hembra durante la oviposición, que produce un pequeño orificio en la superficie del fruto, dejando expuesto a éste a la entrada de microorganismos patógenos que comienzan con su acción de descomposición originando manchas de decoloración en los frutos (Fig. 25B). Además, la larva se alimenta de la pulpa del fruto favoreciendo los procesos de oxidación y maduración prematura, originando la pudrición y la caída temprana del mismo, hecho que lo hace no comercializable.



**Figura 25: A:** Adulto de *C. capitata* W, imagen tomada de <http://www.ica.gov.co/getattachment/>; **B:** Daño provocado en la fruta por *C. capitata*. Imagen tomada de <http://www3.syngenta.com/country/es/sp/cultivos/citricos/plagas>

*C. capitata* posee metamorfosis completa y atraviesa los siguientes estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. El ciclo de vida (a una temperatura de 23°C) tiene una duración de 25 días, desde la oviposición hasta la emergencia del imago, abarcando el



desarrollo embrionario 2 días, la etapa larval 11 días y la etapa dentro del pupario 13 días (Rabossi y col., 1991) (Fig. 26). La hembra deposita aprox. 5 a 10 huevos en cada postura que realiza en la fruta. Cuando las larvas alcanzan el desarrollo completo, salen de la fruta, encorvándose y saltando hasta 40 cm de distancia, se entierran a poca profundidad inmovilizándose para formar el pupario; luego de transcurridos de 6 a 13 días el pupario se abre y emerge el adulto. Cuando los adultos alcanzan 2 o 3 días de edad, ocurre el apareamiento y se re inicia el ciclo (Fig. 26) (Clemente, 2007).



**Figura 26:** Ciclo de vida de *C. capitata* W, imagen tomada de:

<http://www.probodelt.com/es/bibliografia-plagas/ciclo-biologico-ceratitidis.html>

En nuestro país, el INTA (<http://www.inta.gov.ar/manualdecitricultura.html>) recomienda el uso de cebos tóxicos, formados por un insecticida (mercaptotión) y una sustancia atrayente, para el control químico de las moscas. Otros insecticidas utilizados son el dicloro difenil tricloroetano (DDT) y dieldrin, los cuales, además de poseer efectos nocivos sobre el ser humano y el medio ambiente en general, favorecen el desarrollo de resistencia en las plagas. En la actualidad, se encuentra en vigencia el Programa Nacional de Control y Erradicación de la Mosca de los frutos (<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=843&io=2637>), cuyo

objetivo es implementar estrategias de control para disminuir y erradicar la plaga y así, mejorar la inserción y competitividad de los productos frutihortícolas nacionales.

Debido a la importancia de esta plaga por los daños que ocasiona en los montes frutales de nuestro país, se plantea la necesidad de contribuir al desarrollo de un insecticida biodegradable y de bajo impacto toxicológico, que proteja la salud del hombre y su hábitat. En contraposición a los efectos nocivos provocados por los plaguicidas de síntesis química, los bioplaguicidas formulados con principios activos de origen vegetal son biodegradables y pueden ser utilizados poco tiempo antes de la cosecha puesto que no dejan residuos tóxicos en los alimentos, se demora el desarrollo de resistencia en los insectos, no causan fitotoxicidad y no suelen afectar a especies no blanco (Piazza y Barbado, 2005; Céspedes y Alarcón, 2011).

Con los antecedentes hasta aquí planteados y teniendo en cuenta los escasos trabajos realizados en especies nativas de Argentina, considerando las potencialidades como recurso de compuestos bioactivos y la necesidad de conocer y conservar nuestra biodiversidad, es que nos propusimos realizar una investigación interdisciplinaria que nos permita conocer desde los caracteres morfoanatómicos hasta las potenciales actividades de los diferentes extractos de las especies nativas de la Familia Simaroubaceae. Por tal motivo, se plantearon los objetivos descriptos a continuación.

---

### OBJETIVO GENERAL.

---

El objetivo general, planteado al inicio del presente trabajo de tesis, fue contribuir al conocimiento de la flora de la Argentina a través de un estudio interdisciplinario, de las especies nativas de la Familia Simaroubaceae, con el fin de conocer las potencialidades de las mismas como recurso de compuestos bioactivos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

---

- Realizar un relevamiento y recolección de las especies nativas de la Familia Simaroubaceae que habitan en las distintas regiones biogeográficas de Argentina.
- Indagar sobre el estado actual del uso vernáculo de las especies nativas de la Familia Simaroubaceae.
- Estudiar en forma comparada la morfoanatomía de las hojas, maderas y cortezas de las especies nativas de la flora de la Argentina.
- Aplicar el conocimiento de los caracteres morfoanatómicos en la caracterización de las distintas especies como drogas crudas.
- Correlacionar los caracteres morfoanatómicos obtenidos con los factores medioambientales y hábitat donde desarrollan las especies.
- Evaluar la actividad antioxidante los extractos de hojas, cortezas y leños de las especies en estudio.
- Analizar la actividad antiparasitaria de los extractos de hojas, cortezas y leños de las especies en estudio, frente a *Tripanosoma cruzi*.
- Proponer una o más de las especies estudiadas para que en función de su potencial medicinal y de sus características morfoanatómicas puedan ser recomendadas para continuar su estudio y desarrollo.
- Evaluar la actividad tripanocida e insecticida de la o las especies promisorias seleccionadas.
- Realizar la caracterización fitoquímica del o de los extractos de la o las especies que presenten actividad biológica promisorias.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1-Material Vegetal.

En el presente trabajo se emplearon materiales frescos recolectados en diferentes campañas de colección, que se detallan a continuación para cada especie. El material fresco coleccionado fue fotografiado; del mismo se confeccionaron ejemplares de herbario, los cuales se encuentran depositados en el herbario de la Universidad Nacional de Rosario (**UNR**) y en el herbario del Área Biología Vegetal del Departamento de Ciencias. Biológicas de la Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

Se consultó material de referencia pertenecientes a los siguientes herbarios nacionales, ordenados alfabéticamente según la sigla tomada del Index Herbariorum (Holmgren y col., 1990): Herbario "Gaspar Xuarez" Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (**BAA**), Herbario Museo de Farmacobotánica "Juan A. Dominguez," Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (**BAF**), Herbario Instituto de Botánica del Nordeste, Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (**CTES**), Herbario Museo de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta (**MCNS**), Herbario Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Litoral (**SF**), Herbario del Instituto de Botánica Darwinion (**SI**) y Herbario Botánico y Ecología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (**UNR**).

#### *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle.

##### **Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. Prov. Buenos Aires: Loc. La Plata, "bosque", 30/XI/48, Fabris 221 (SI); Loc. Azul, 6/XII/70, Burkart y Múlgura 28181 (SI). Prov. Tucumán: Dpto. Burrayaco. Loc. Cerro del Campo, 3/8/29, Venturi 9303 (SI).

##### **Material recolectado:**

Las hojas y ramas de *A. altissima* fueron recolectadas en el parque Alem en la Ciudad de Rosario, provincia de Santa Fe.

ARGENTINA. Prov. Santa Fe: Dpto. Rosario, Loc. Rosario, parque Alem, 29-V-08. Gattuso, 1940 (UNR); Dpto. Rosario, Loc. Rosario, parque Alem, 9-XII-08, Gattuso 1946 (Herbario de la Cátedra). Dpto. Rosario, Loc. Rosario, parque Alem 18-IV-2009, Gattuso 2014 (UNR).

#### *Alvaradoa subovata* Cronquist

##### **Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. Prov. Jujuy: Dpto. Valle Grande, R. Jordán. 28-XII-1977, Kiesling y Ulibarry 1634 (SI); Dpto. Santa Bárbara, Abra de los Morteros. 26-I-1975, Zuloaga y Deginiani 278 (SI). Prov. Salta: Dpto. Orán, ruta Prov.18 a 3-4Km. del Puente Internacional Argentina-



Bolivia. 22° 43'S 64°43'W, 1-V-2003, Morrone y col. 4536 (SI); *Dpto. La Viña*, 2-II-1951, Hunziker 1226 (SI).

**Material recolectado:**

La recolección de *A. subovata* se realizó en dos campañas: la primera en la provincia de Tucumán en el año 2007, y la segunda en la provincia de Salta en el año 2010 (Figura 27A-C).

ARGENTINA. *Prov. Tucumán, Dpto. Burruyacú*, 7-VII-2007, Ponesa 2030 (UNR). *Prov. de Salta, Dpto. Chicoana*, Quebrada de Escoipe (25° 09' 38,7" S- 65°37' 0" O); (25° 06' 35,8" S- 65°36' 2,4" O) 14-XII-2010, Campagna y Quiroga s/n° (UNR). *Parque Nac. Los Laureles*, (25° 06' 17,9" S- 65° 35' 44,9" O) 14-XII-2010, Campagna, M.N. y Quiroga M. s/n° (UNR).

***Castela coccinea* Griseb.**

**Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. *Prov. Jujuy: Dpto. San Pedro*, Cerritos de San Pedro a 700m, -X-1930, Venturi 19546 (SI). *Prov. Salta: Dpto. Oran*, Río Piedras, 13-XI-1911, Rodríguez 76 (SI). *Prov. Chaco: Dpto. 1 de Mayo*, Colonia Benítez, 30-IX-1971, Martínez et al 9479 (BAA); *Dpto. Resistencia*, A 5Km. al S de Resistencia, 24-IX-1986, Pire 7707 (UNR). *Prov. Santiago del Estero: Dpto. Robles*, Ventura, 11-I-2008, Oakley 66 (UNR). *Prov. Santa Fe: Dpto. Vera*, Las Gamas, 12-I-1989, Pire 2641 (UNR); *Dpto. 9 de Julio*, Al O de Sta. Margarita, 25-IX-1981, Lewis 3255 (UNR); *Ruta 35 El Cuadrado*, 25-IX-1981, Pire 3262 (UNR); *Dpto. San Javier*, Ruta 11 arroyo El Toba, 14-XII-1982, Pire 1177 (UNR).

**Material recolectado:**

*Las hojas y ramas de C. coccinea fueron recolectadas en la provincia del Chaco y en el norte de la Provincia de Santa Fe.*

*Prov. Del Chaco. Dpto. Chacabuco*, Charata, 24-I-2008, Oakley y Festa 73 (UNR). *Prov. Santa Fe. Dpto. Gral. Obligado*, próximo a Berna, 17-XII-2004, Pensiero 6943 (SF). *Berna*, (29° 16' 58,8" S- 59° 50' 41,2" O), 25-I-11, Oakley s/n°. *ruta Nac. 11* próximo a Berna (29° 16' 58,6" S- 59° 50' 42,6" O), 15-III-11, Pensiero 8610 (SF).

***Castela twedii* Planch.**

**Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. *Prov. Misiones: Dpto. Iguazú*, Loc. El Dorado, 1-II-1951, Montes 15413 (MO); *Santa Ana*, Rodríguez 514 s/f (SI); *Dpto. Candelaria*, Loreto, 31-II-44, Montes 249 (SI). *Prov. Chaco: Dpto. 1 de Mayo*, arroyo Iné ruta nacional 11, 15-II-67, Krapovickas 13027 (SI); *Prov. Entre Ríos: Dpto. La Paz*, Paso Yunque, río Guayquiraró, 7-XI-73, Burkart et al 29950. (SI); *Dpto. Uruguay*, Loc. Concepción del Uruguay, arroyo La China, 25-IX-61, Burkart 22616 (SI); *Dpto. Uruguay*, Loc. Concepción del Uruguay, arroyo El Curro, 19-X-49, Burkart 91534 (SI); *Dpto. Villaguay*, Loc. Villaguay, 13-X-62, Chiarelli s/n° 91534 (BAB); *Paraná*, 16-II-80, Jozami y Muñoz 584 (SI); *Paraná*, Paracao, 31-X-62, Burkart 23705 (SI). *Prov. Santa Fe: Dpto*

*San Lorenzo*, Monte Histórico, 27-IX-76, Lewis 1430 (UNR); *Dpto San Jerónimo*, Loc. Pto Gaboto, 26-VIII-82, Fernández Jorge 6164 (UNR); *Dpto Rosario*, Arroyo Frias, 14-IX-86, Fernández Jorge 7651(UNR);

**Material recolectado:**

Las hojas y ramas de *C. tweedii* fueron obtenidas en distintas campañas: La primera en el año 2007 en la provincia de Corrientes, las siguientes en la Provincia de Santa Fe, en la localidad de Puerto Gaboto en los años 2010 y 2011 (Figura 27D-F)

ARGENTINA. *Prov. Corrientes*: *Dpto. Curuzú Cuatiá*, ruta Prov. 23, 2km al sur de Perugerria, 24-XI-07, Oakley, Giacoboni y De Felipe 055 (UNR). *Prov. De Santa Fe, Dpto San Jerónimo*, Loc. Pto Gaboto, Monte Histórico, 09-V-10, Gattuso 2016. (Herbario de La cátedra). Pto. Gaboto, Monte Histórico, 03-X-10, Gattuso s/n°.

*Picramnia parvifolia* Engl.

**Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. *Prov. Misiones*: *Dpto. San Pedro*, Arroyo San Pedro, 1-XI-1958, Gamero y Toursarkissian 69 (SI). *Prov. Corrientes*: *Dpto. Santo Tomé*, Santo Tomé, 7-XII-1997, Múlgura et al. 1589 (SI).

**Material recolectado:**

La primer campaña se realizó en la provincia de Corrientes, en la localidad de Santo Tome, según datos obtenidos de ejemplares de herbario, sin embargo no pudo hallarse ningun ejemplar de esta especie en dicha campaña (Figura 27G-I). La siguiente campaña fue en la localidad de El Dorado en la provincia de Misiones.

ARGENTINA. *Prov. Misiones*: *Dpto. El Dorado*, El Dorado (26° 23' 43" S – 54°38' 28" O, 233 m.s.n.m) 28-X-11, Keller s/n° (UNR). *Dpto. Gral. Manuel Belgrano*, Bernardo de Irigoyen (26°18' 30,9" S- 53°39' 53,8" O, 699 m.s.n.m) 06-X-2011, Capiera, Keller 9394 (CTES)

*Picramnia sellowii* Planch.

**Material de herbario consultado:**

ARGENTINA. *Prov. Formosa*: s/f. Jorgensen 3260 (SI). *Prov. Misiones*: *Dpto. Gral. Belgrano*, Bernardo de Irigoyen 2 Km al S de B. de Irigoyen sobre nacimiento del río Pepirí Guazú, (26°16'S 53°38'W), 15-X-1996, Morrone et AL. 1426, (SI); *Dpto. San Ignacio*, Peñón del Teyucaré, (27°16' S 55°35'W), 20-IX-2000, Múlgura et al. 2157 (SI); *Dpto. Posadas*, Posadas, 17-I-1930, Rodríguez 27 (SI). *Prov. Corrientes*: *Dpto. Loreto*, Timbó Paso, 5-V-45, Huidobor 2179 (SI).

**Material recolectado:**

Las hojas y ramas de *P. sellowii* fueron recolectadas en dos campañas: la primera en la provincia de Misiones en el año 2009 y la última en la provincia de Corrientes en el año 2011.

ARGENTINA: Prov. Chaco: Dpto. Bermejo, arroyo Zapirán y ruta 11, (26° 51' 51,8" S- 58° 45' 46,7" O), 23-XI-2007, Oakley *et al.* 53 (UNR). Prov. Corrientes: Dpto Ituzangó, río aguapey y ruta 38 (27° 49' 27,8" S- 56° 15' 32,6" O), 29-I-11, Oakley s/n°. Prov. Misiones, Dpto. Candelaria, Sta. Ana. 10-XII-09, Holman s/n°.

*Picrasma crenata* (Vell.) Engl., Engl. u. Prantl.

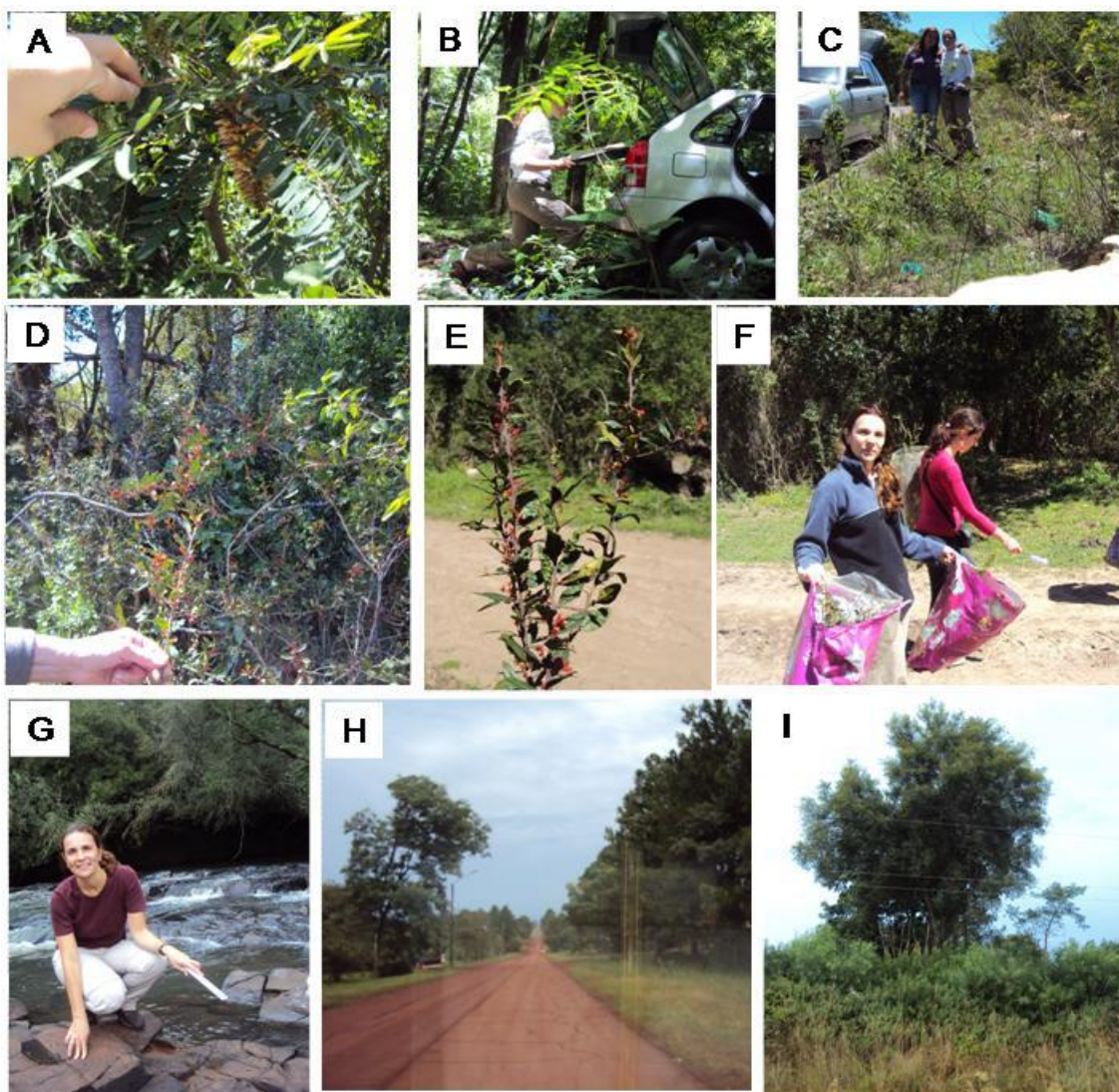
**Material de herbario consultado:**

ARGENTINA: Prov. Misiones: Dpto Guaraní, (26° 54' 00" S 54° 18' 00" O), 03-XI-99, Tressens *et al.* 6473 (SI). Dpto. Guaraní, s/fecha, Keller 3812 (CTES), Dpto Iguazú, 21-IIX-10, Rodriguez -1, 27 (SI).

**Material recolectado:**

Las hojas y ramas de *P. crenata* fueron recolectadas en la provincia de Misiones, además se obtuvo corteza gentileza del establecimiento Platario S.A que posee cultivos con fines comerciales de la especie.

ARGENTINA. Prov. Misiones: Dto guaraní. Loc. San Vicente. De cultivo Holman s/n°; cultivo Establecimiento Platario S.A. 02-I-10; Dpto Gral. Manuel Belgrano, Loc. Colonia Integración, 15-X-09, Holman; Dpto Gral. Manuel Belgrano, Loc. Colonia Integración, 20-XII-2009, Holman, B. s/n°



**Figura 27:** A-C: Campaña de recolección de *A. subovata*; A: Rama con frutos; B: Sitio de recolección Parque Nacional los Laureles, Prov. de Salta; C: Sitio de recolección quebrada de Escoipe, Prov. de Salta; D-F: Campaña de recolección de *C. tweedii*; D: Población natural; E: Ejemplar joven con flores; sitio de recolección Monte Histórico, Prov. de Santa Fe; G-I: Campaña de recolección de *P. parvifolia*; G: Sitio de recolección arroyo San Pedro, Prov. de Misiones; H-I: Dpto. Santo Tome, Prov. de Corrientes.

## 2-Metodología para el estudio morfoanatómico

### 2.1-Técnicas para la observación con MO.

Tanto en el estudio de las hojas, cortezas y leños, las observaciones microscópicas se efectuaron con: microscopio óptico Olympus CH30-LB system equipado con ocular micrométrico y tubo de dibujo BH2-DA, con microscopio óptico Nikon Alphaphot YS equipado con tubo de dibujo, con microscopio óptico Zeiss Axiolab y con microscopio estereoscópico Nikon Type 104.



La distribución de los cristales de oxalato de calcio fue analizada utilizando Microscopio Carl Zeiss Axiolab con luz polarizada.

Las ilustraciones son originales y fueron realizadas con microscopio óptico (MO) Olympus CH30-LB system equipado con ocular micrométrico y tubo de dibujo BH2-DA. Para los esquemas se siguió la simbología de Metcalfe y Chalk (1950).

Las fotomicrografías al microscopio óptico se obtuvieron con PM 10 ADS Olympus Automatic Photomicrographic System y microscopio óptico Zeiss Axiolab, con equipo fotográfico MC 80 y Scopephoto® 3.0.

### **2.1.1-Hojas:**

Se utilizó material herborizado y fresco. El material fresco fue fijado en FAA (alcohol etílico 70°, ácido acético glacial, formaldehído y agua 50:5:30:15). El material herborizado fue hidratado por hervor con agua adicionada de unas gotas de reactivo tensioactivo.

Para el estudio de las hojas, las láminas y pecíolos, se realizaron cortes transversales en la parte media de los mismos, a mano libre, con micrótopo de mano, micrótopo tipo Minot, y ultramicrótopo, previa inclusión en parafina o resina (Gattuso y Gattuso, 2002).

#### *Técnica de corte a mano libre:*

Se utilizó como soporte del material a cortar médula de hinojo. Los cortes se realizaron con hoja de afeitar, o con cuchilla cuando se utilizó el micrótopo de mano. Los cortes se recogieron en vidrio de reloj con agua destilada y se seleccionaron los más delgados bajo lupa. Los cortes seleccionados se clarificaron con hipoclorito de sodio al 50%, y se colorearon con safranina acuosa al 1% (D' Ambrogio, 1986), o con Safranina Fast-Green (Gattuso y Gattuso, 2002) (Tabla 5).

Los cortes coloreados con safranina acuosa fueron montados con gelatina glicerina, los cortes coloreados con Safranina Fast-Green y deshidratados fueron montados con Bálsamo de Canadá.

#### *Técnica de inclusión en parafina:*

Se parte de material previamente fijado en FAA, el cual es lavado para eliminar el exceso de fijador. A continuación, se deshidrató en una serie de soluciones de etanol y posteriormente se infiltró en soluciones de etanol/xilol y xilol, previo a la inclusión en parafina como se describe en la tabla 2. Con el material infiltrado en parafina, y en caliente, se confecciona un bloque de parafina adherido a un taco de madera para facilitar los cortes (D'Ambrogio, 1986). Los cortes se realizaron en secciones de 12 µm de espesor con micrótopo tipo Minot, luego se desparafinaron (Tabla 3), colorearon y montaron con Bálsamo de Canadá. La coloración empleada fue Safranina-Fast Green (Tabla 4) (Strittmatter, 1979) o Violeta de cresilo (Tabla 5) (Strittmatter, 1980, D' Ambrogio, 1986).

	<b>Solución</b>	<b>Tiempo de incubación</b>
Deshidratación	Etanol 70°	2h
	Etanol 80°	12-24h
	Etanol 90°	12-24h
	Etanol 96°	24h
	Etanol 100°	12h
	Etanol 100°	12h
Clarificación	Etanol 100°-Xilol 3:1	3h
	Etanol 100°-Xilol 1:1	3h
	Etanol 100°-Xilol 1:3	3h
	Xilol	1 noche
	Xilol	2h
Infiltración 60°C	Xilol-parafina 3:1	6h
	Xilol-parafina 1:3	6h
	Parafina	1 noche
	Parafina	2h

**Tabla 2:** Protocolo para el procesamiento de muestras para su inclusión en parafina y corte.

	<b>Solución</b>	<b>Tiempo de incubación</b>
<b>Desparafinado</b>	Xilol 1	30-60 min.
	Xilol 2	30 min.
	Etanol 100°	10 min.
	Etanol 96°	10 min.
	Etanol 90°	10 min.

**Tabla 3:** Procesamiento de secciones incluidas en parafina, previo al proceso de tinción.

Solución	Tiempo de incubación y coloración para material no incluido clarificado			Tiempo de incubación y coloración para material incluido
	Hojas	Cortezas	Leños	
Etanol 70°	1 min.	1 min.	1 min.	-
Safranina (saturada etanol 80°)	15-20 min.	20-30 min.	20-30 min.	120 min. a 12 hs
Etanol 96°	lavado	lavado	lavado	1-2 min.
Fast green (Saturado etanol 100°)	Pasaje rápido	Pasaje rápido	Pasaje rápido	1 min.
Etanol 100°	lavado	lavado	lavado	lavado
Etanol 100°	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.
Xilol	5 min. o más	5 min. o más	5 min. o más	5 min. o más

**Tabla 4:** Protocolo de coloración con Safranina–Fast Green.

Solución	Tiempo de incubación para material diafanizado	Tiempo de incubación para material incluido
Etanol 80°	-	10 min.
Etanol 70°	2-3 min.	10 min.
Etanol 50°	2-3 min.	10 min.
Violeta de cresilo 0,5 %	1 min.	15 min.
Etanol 50°	-	2-3 min.
Etanol 70°	2-3 min	5 min.
Etanol 80°	2-3 min	5 min.
Etanol 90°	2-3 min	5 min.
Etanol 100°	2-3 min	5 min.
Etanol 100°	2-3 min	5 min.
Xilol	2-3 min	5 min. o más

**Tabla 5:** Protocolo de coloración con Violeta de Cresilo

#### *Técnica de inclusión en resina:*

El material se fijó en F.A.A., se lavó con agua destilada y se continuó con una deshidratación en acetona de concentración ascendente, finalmente el material se infiltró e incluyó en resinas Spurr según Tabla 6 (Union Carbide International Co.). Se obtuvieron secciones finas de 1µm de espesor, con un ultramicrotomo provisto con cuchilla de diamante. Los cortes finos se colorearon con azul de metileno al 1 % y fucsina ácida al 1% (D'Ambrogio, 1986).

Deshidratación	Solución	Tiempo de incubación
	Acetona 30°	30-60 min.
	Acetona 50°	15 min.
	Acetona 70°	15 min
	Acetona 90°	15 min
	Acetona pura	30 min.
	Acetona 30°	30-60 min.
Infiltración	Acetona : Óxido de propileno 1:1	30 min.
	Óxido de propileno	30 min., 4°C
	Óxido de propileno: Resina 1:1	12h, T. ambiente
	Resina	1-2 h, 60° C

**Tabla 6:** Protocolo para el procesamiento de muestras para su inclusión en resina y corte.

Para el análisis de las epidermis, venación y micrografía cuantitativa, las láminas foliares se diafanizaron según la técnica de Strittmatter (1973) levemente modificada (Tabla 7). Al material así obtenido se lo coloreó con Safranina al 1% en agua y se montaron con gelatina glicerina; o con Violeta de Cresilo (Strittmater, 1980) y montados con Bálsamo de Canadá (Tabla 5).

Se determinaron los siguientes parámetros cuantitativos: índice de estomas (Salisbury, 1927), estomas por milímetro cuadrado (Timmerman, 1927), índice de empalizada (Zorning y Weiss, 1925), longitud y densidad de pelos simples; para todas estas medidas se trabajó con objetivo de 40x con un ocular de 10x, y se calcularon las medias aritméticas (x) con su correspondiente desvío estándar sobre 10 campos.

Para la descripción de la arquitectura foliar se utilizó la terminología de Hickey (1973) y para los pelos Üphof y col., (1962).

Solución	Tiempo de incubación
Etanol 96°	10 min. a ebullición
Etanol-hidróxido de sodio 5% 1:1	5-10 min. a ebullición
Agua destilada	Lavados de 2-3 min.
Hipoclorito de sodio 50%	20 min.
Agua destilada	Lavados de 2-3 min.
Hidrato de cloral	10-15 min. mínimo
Safranina acuosa 1%	5 min.

**Tabla 7:** Protocolo para la técnica de diafanizado.



### 2.1.2-Cortezas.

Las muestras se fijaron en una mezcla de glicerina, alcohol etílico 96°, agua (1:1:1) y se ablandaron posteriormente sumergiéndolas en una solución de etanol 70°- agua (1:1) durante 1 a 3 días.

Se realizaron cortes transversales de 10-15  $\mu\text{m}$  de espesor, con micrótopo de deslizamiento y ultramicrótopo. Las secciones se tiñeron con Safranina-Fast Green (Strittmater, 1979) o Violeta de cresilo (Strittmater, 1980) y se montaron con Bálsamo de Canadá (Tabla 4 y 5).

Las cortezas se maceraron aplicando la técnica de Boodle (1916) como se indica en la Tabla 8 y las preparaciones histológicas se montaron de forma semipermanente usando gelatina glicerina. Se realizaron determinaciones cuantitativas de las dimensiones de los diferentes tipos celulares observados (longitud y latitud) utilizando microscopio óptico Olympus CH30-LB system equipado con ocular micrométrico y tubo de dibujo BH2-DA. Para todas las determinaciones se calcularon las medias aritméticas ( $\bar{x}$ ) con su correspondiente desvío estándar sobre 10 campos. La descripción macro y microscópica de las cortezas se realizó utilizando la terminología de Junikka (1994) y Trockenbrodt (1990).

### 2.1.3-Leños.

Las muestras se fijaron en una mezcla de glicerina, alcohol etílico 96°, agua (1:1:1) y se ablandaron posteriormente sumergiéndolas en una solución de etanol 70°- agua (1:1) durante 1 a 3 días.

Se realizaron cortes transversales y longitudinales (radiales y tangenciales) de 10-15  $\mu\text{m}$  de espesor, con micrótopo de deslizamiento. Todas las secciones se tiñeron con Safranina-Fast Green (Strittmater, 1979) y se montaron con Bálsamo de Canadá (Tabla 4). Los leños se maceraron aplicando la técnica de Boodle (1916) (Tabla 8) y las preparaciones histológicas se montaron de forma semipermanente usando gelatina glicerina. Se realizaron determinaciones cuantitativas de las dimensiones de los diferentes tipos celulares observados (longitud y latitud), como así también la densidad de vasos por milímetro cuadrado (Wheeler y col., 1989) utilizando microscopio óptico Olympus CH30-LB system equipado con ocular micrométrico y tubo de dibujo BH2-DA. Para todas las determinaciones se calcularon las medias aritméticas ( $\bar{x}$ ) con su correspondiente desvío estándar sobre 10 campos. Para la descripción de los elementos del leño se usó IAWA Committee (Wheeler y col., 1989).

Solución	Tiempo de incubación y coloración
Hidróxido de potasio 10%	5-10 min. a ebullición
Agua destilada	Lavados de 1-2 min.
Ácido crómico 25%	30 min.
Agua destilada	Lavados 2-3 min.
Safranina acuosa al 1%	Agitación vigorosa

**Tabla 8:** Protocolo para la técnica de maceración.

Se calcularon los índices de vulnerabilidad (IV) y mesomorfía (IM) propuestos por Carlquist (1977), Las fórmulas utilizadas para cada uno de estos índices fueron las siguientes:

$$IV = \text{Diámetro de vasos/vasos por mm}^2$$

$$IM = IV \times \text{Longitud de los vasos}$$

El IV expresa el grado de vulnerabilidad a sufrir cavitaciones por parte del xilema (Carlquist, 1977), es decir, nos da una idea de la seguridad en la conducción del mismo (Moglia y Gimenez, 1998). Valores mayores a uno indican vulnerabilidad frente a estrés hídrico. El IM expresa el grado de mesomorfía o xeromorfía que presenta una planta (Carlquist, 1977). Valores mayores a 200 indican que el xilema tiene carácter mesofítico, y valores menores a 200 coinciden con plantas cuyos xilemas son considerados xerofíticos (Montaño-Arias y col., 2013).

### *2.2-Técnica para la observación con MEB.*

Para la observación con MEB de las epidermis adaxial y abaxial de las hojas se seleccionaron porciones del tercio medio de las láminas que comprenden el nervio medio o el borde. También, se seleccionaron secciones transversales y longitudinales de los leños.

El material fresco se fijó durante 3 hs en una solución de glutaraldehído al 4 % en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,2 (monosódico-disódico) (O' Brien y Mc Cully, 1981; D' Ambrogio, 1986). Posteriormente se lavó el material con buffer lavador (buffer fosfato 0,1 M, pH = 7,2; sacarosa 0,2 M). A continuación se realizó la deshidratación por pasajes sucesivos de 1-4 h del material en soluciones descriptas en la tabla 9. Las muestras se adhirieron con una cinta doble faz a un porta-muestras metálico y se colocaron en un desecador con Si gel durante una noche. Las muestras así tratadas fueron metalizadas usando un baño de oro-paladio y empleando un evaporador marca Veeco que operó a 1500 V, 70 mmHg en atmósfera de Argón durante 10 min. La película metálica fue de 20 nm de espesor (O'Brien y Mc Cully, 1981). Las observaciones se realizaron en el Instituto de Física de Rosario (IFIR), utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB) Leitz AMR 1000, equipado con un detector de rayos X dispersivo de silicio/litio acoplado a un analizador y computador EDAX.

Los cristales presentes en las muestras fueron analizados por difracción de rayos X, MEB-EDAX (Ipohorski y Marrapodi, 1981).

DESHIDRATACIÓN	Solución
	EtOH 96 %:H <sub>2</sub> O:t-BuOH (5:4:1; 5:3:2; 5:1,5:3,5)
	EtOH 96 %:t-BuOH (5:5)
	EtOH 100 %:t-BuOH (2,5:7,5)
	t-BuOH 100%

**Tabla 9:** Protocolo para la deshidratación de muestras para su observación en MEB.

### 2.3- Pruebas histoquímicas.

Se efectuaron diversas pruebas histoquímicas para detectar contenidos celulares y componentes de la pared celular. Se realizaron cortes transversales de material fresco y se utilizaron los siguientes reactivos (D'Ambrogio, 1986; Gattuso y Gattuso, 2002; Upton y col., 2011):

- Sudán IV para la detección de lípidos y aceites esenciales.
- Solución acuosa de sulfato férrico al 10% P/V para la detección de taninos.
- Violeta de cresilo para la detección de mucílagos.

Para la detección de cristales de oxalato de calcio se utilizó luz polarizada y difracción de rayos X, MEB-EDAX (Ipohorski y Marrapodi, 1981).

## 3-Metodología para la Evaluación de las Actividades Biológicas.

### 3.1-Obtención de los extractos:

Las hojas, cortezas y leños de *Alvaradoa subovata* (**As**), *Picramnia sellowii* (**Ps**), *Picramnia parvifolia* (**Pp**), *Castela coccinea* (**Cc**), *Castela tweedii* (**Ct**), *Ailanthus altissima* (**Aa**) y *Picrasma crenata* (**Pc**) secas y molidas fueron extraídas con diclorometano (DCM) a temperatura ambiente (3 veces x 24h). Los respectivos extractos se filtraron y concentraron a presión reducida en evaporador rotatorio RII-Buchii, obteniéndose los respectivos extractos secos (tabla 10). Cantidades similares (se expresan en la Tabla 11) de hojas, cortezas y leños de *Alvaradoa subovata* (**As**), *Picramnia sellowii* (**Ps**), *Picramnia parvifolia* (**Pp**), *Castela coccínea* (**Cc**), *Castela tweedii* (**Ct**), *Ailanthus altissima* (**Aa**) y *Picrasma crenata* (**Pc**) secas y molidas fueron extraídas por maceración con etanol (ETOH) a temperatura ambiente (3 veces X 24 horas). Los respectivos extractos se filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose los respectivos extractos secos.

Espece	Extracto DCM	Peso material de partida
<i>Ailanthus altissima</i> (Aa)	Hoja DCM (Aa H <sub>DCM</sub> )	5,0g
	Corteza DCM (Aa C <sub>DCM</sub> )	6,8g
	Madera DCM (Aa M <sub>DCM</sub> )	5,8g
<i>Alvaradoa subovata</i> (As)	Hoja DCM (As H <sub>DCM</sub> )	5,0g
	Corteza DCM (As C <sub>DCM</sub> )	3,8g
	Madera DCM (As M <sub>DCM</sub> )	5,0g
<i>Castela coccinea</i> (Cc)	Hoja DCM (Cc H <sub>DCM</sub> )	20,0g
	Corteza DCM (Cc C <sub>DCM</sub> )	40,0g
	Madera DCM (Cc M <sub>DCM</sub> )	40,0g
<i>Castela tweedii</i> (Ct)	Hoja DCM (Ct H <sub>DCM</sub> )	2,3g
	Corteza DCM (Ct C <sub>DCM</sub> )	8,6g
	Madera DCM (Ct M <sub>DCM</sub> )	8,9g
<i>Picramnia parvifolia</i> (Pp)	Hoja DCM (Pp H <sub>DCM</sub> )	6,5g
	Corteza DCM (Pp C <sub>DCM</sub> )	3,7g
	Madera DCM (Pp M <sub>DCM</sub> )	6,0g
<i>Picramnia sellowii</i> (Ps)	Hoja DCM (Ps H <sub>DCM</sub> )	5,0g
	Corteza DCM (Ps C <sub>DCM</sub> )	6,1g
	Madera DCM (Ps M <sub>DCM</sub> )	5,1g
<i>Picrasma crenata</i> (Pc)	Hoja DCM (Pc H <sub>DCM</sub> )	5,0g
	Corteza DCM (Pc C <sub>DCM</sub> )	14,2g
	Madera DCM (Pc M <sub>DCM</sub> )	12,8g

Tabla 10: Obtención de extractos diclorometánicos



Especie	Extractos Etanólicos	Peso material de partida
<i>Ailanthus altissima</i> (Aa)	Hoja EtOH (Aa H <sub>EtOH</sub> )	5,0g
	Corteza EtOH (Aa C <sub>EtOH</sub> )	6,0g
	Madera EtOH (Aa M <sub>EtOH</sub> )	4,3g
<i>Alvaradoa subovata</i> (Aa)	Hoja EtOH (As H <sub>EtOH</sub> )	5,0g
	Corteza EtOH (As C <sub>EtOH</sub> )	3,8g
	Madera EtOH (As M <sub>EtOH</sub> )	9,0g
<i>Castela coccínea</i> (Cc)	Hoja EtOH (Cc H <sub>EtOH</sub> )	10,0g
	Corteza EtOH (Cc C <sub>EtOH</sub> )	10,0g
	Madera EtOH (Cc M <sub>EtOH</sub> )	15,0g
<i>Castela tweedii</i> (Ct)	Hoja EtOH (Ct H <sub>EtOH</sub> )	8,3g
	Corteza EtOH (Ct C <sub>EtOH</sub> )	6,5g
	Madera EtOH (Ct M <sub>EtOH</sub> )	7,0g
<i>Picramnia parvifolia</i> (Pp)	Hoja EtOH (Pp H <sub>EtOH</sub> )	7,0g
	Corteza EtOH (Pp C <sub>EtOH</sub> )	3,0g
	Madera EtOH (Pp M <sub>EtOH</sub> )	5,1g
<i>Picramnia sellowii</i> (Ps)	Hoja EtOH (Ps H <sub>EtOH</sub> )	5,1g
	Corteza EtOH (Ps C <sub>EtOH</sub> )	3,7g
	Madera EtOH (Ps M <sub>EtOH</sub> )	6,1g
<i>Picrasma crenata</i> (Pc)	Hoja EtOH (Pc H <sub>EtOH</sub> )	4,8g
	Corteza EtOH (Pc C <sub>EtOH</sub> )	11,0g
	Madera EtOH (Pc M <sub>EtOH</sub> )	10,0g

**Tabla 11:** Obtención de extractos etanólicos:

Los respectivos extractos se re-suspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para realizar los ensayos de actividad tripanocida y en etanol para los ensayos de actividad antioxidante.

### 3.2-Ensayos de la actividad antioxidante: Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres

#### 3.2.1-Análisis cuantitativo.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos diclorometánicos y etanólicos se utilizó el reactivo 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH) (PM= 394.33) (Sigma Aldrich Chemicals Company, EEUU) preparado en solución alcohólica con etanol calidad pro-análisis.

El experimento se realizó de acuerdo al método de Blois (Blois, 1958) levemente modificado (Molyneux, 2004; Argolo y col., 2004). Una alícuota de cada extracto (20µL) se diluye en etanol (con concentraciones de los extractos que van desde 0.01 a 0.2 mg/mL) y se agrega una solución etanólica 90mM del radical DPPH, llevando a un volumen final de 1mL. Para el extracto etanólico de corteza de *A. subovata* se utilizaron concentraciones menores de extracto debido a su elevada actividad (alícuotas de 2 a 5µL para igual volumen final). Se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm, cada 1minuto, hasta los 20min., ya que durante este tiempo el radical es estable. Los valores de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro BioChrom DC1, con cubetas plásticas de 1,5 mL y paso óptico de 0,5 cm. Se utilizó ácido ascórbico como control positivo (0,05 mg/mL) y la solución de DPPH sólo con etanol como control negativo.

Se calculó el porcentaje de depuración, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Depuración} = (\text{Abs. control negativo} - \text{Abs. muestra}) / \text{Abs. control negativo} \times 100$$

Se obtuvo también la Concentración Inhibitoria del 50 % (CI<sub>50</sub>) de las muestras, definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50 % la concentración inicial (135 µM) del radical DPPH. El valor de CI<sub>50</sub> fue determinado mediante extrapolación de una regresión lineal de la gráfica de porcentaje de depuración del radical DPPH en función de la concentración de extracto. Para la realización de los gráficos se utilizó el programa Sigma Plot 10.0®.

### 3.2.2-Análisis cualitativo.

Se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD): se sembró una alícuota de 10 µl de cada uno de los extractos evaluados (2 mg/mL), sobre una placa de CCD (Silica gel 60 F<sub>254</sub>; Merck Labs., Alemania). Las placas fueron reveladas con una solución etanólica de DPPH 0,4 mM (Argolo y col., 2004). Las fases móviles utilizadas para eluir los extractos fueron las siguientes:

- Hexano: Acetato de etilo: Ácido fórmico (75:25:1)
- Acetato de etilo: Metanol: Agua (100: 13,5:10)
- Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua (100: 11:11:26)
- Cloroformo: Ácido acético glacial: Metanol: Agua (60:32:12:8)
- Cloroformo: Metanol (95:5)
- Cloroformo: Metanol (90:10)
- Cloruro de metileno: Metanol (90:10)

Los compuestos con capacidad antioxidante fueron revelados sobre un fondo púrpura como bandas amarillas cuya intensidad depende de la cantidad y del tipo de antioxidante presente en la muestra. Para caracterizar la naturaleza química de los compuestos

antioxidantes se realizaron duplicados de las placas analizadas con DPPH que fueron visualizadas con luz visible, luz UV de 254 nm y 365nm y los siguientes reactivos reveladores (Wagner & Bladt, 2001):

- Reactivo de Productos Naturales - Polietilenglicol (RPN-PEG): solución de 2-aminoetil difenilborinato al 1 % en metanol y polietilenglicol al 5 %.
- Anisaldehído sulfúrico (AS): 0,5 mL de anisaldehído mezclado con 10 mL de ácido acético glacial, seguido del agregado de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Reactivo de Bortränger (KOH): hidróxido de potasio etanólico 10%,
- Solución cloruro férrico al 10% P/V en agua.

### *3.3-Ensayo de la Actividad Tripanocida.*

Epimastigotes de cepa CL Brener fueron cultivados en medio LIT suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) a  $28 \pm 0,5^\circ$  C en placas de 24 pocillos (Camargo, 1964). Cultivos de  $3-4 \times 10^6$  parásitos/mL fueron incubados con cantidades crecientes de cada extracto.

El crecimiento parasitario fue monitoreado por conteo en una cámara de Neubauer. El porcentaje de inhibición fue calculado como la proporción entre el crecimiento parasitario en presencia y ausencia de cada extracto utilizado, después de 72 horas de incubación. El valor de  $CI_{50}$  fue calculado a partir de la gráfica de porcentaje de inhibición en función de la concentración de extracto.

Cada experimento fue realizado por triplicado. Se utilizó la droga tripanocida Benznidazol como control positivo. La concentración ensayada fue de 100µg/mL y los extractos fueron re suspendidos en DMSO.

Este ensayo fue realizado en de la Cátedra de Parasitología, en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. en colaboración con la Dra. Isabel Nocito.

### *4-Metodología para la Evaluación de la Actividad Biológica de Castela tweedii.*

267g de hojas, 216g de corteza y 402g de leño seco y molido de *C. tweedii* fueron extraídos por maceración con diclorometano (3 veces consecutivas). Los respectivos extractos se filtraron, se reunieron y concentraron a presión reducida. Se obtuvieron: 7,04g de extracto seco de hoja DCM (**CtH<sub>DCM</sub>**), 3,46g de extracto seco de corteza DCM (**CtC<sub>DCM</sub>**) y 2.87g de extracto seco de leño DCM (**CtM<sub>DCM</sub>**). Los marcos de la extracción con diclorometano, fueron secados a temperatura ambiente para eliminar restos de DCM, se extrajeron con metanol (MeOH) (3 veces consecutivas). Los respectivos extractos se filtraron, se reunieron, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron. Se obtuvieron: 47,4g de extracto liofilizado de

hojas MeOH (**CtH<sub>MeOH</sub>**), 12,5g de extracto liofilizado de corteza MeOH (**CtC<sub>MeOH</sub>**) y 17,2g de extracto liofilizado de leño MeOH (**CtM<sub>MeOH</sub>**).

#### 4.1-Ensayos de Actividad Tripanocida.

Los extractos diclorometánicos y metanólicos de hoja, corteza y leño de *C. tweedii* fueron re suspendidos en DMSO. Los ensayos fueron realizados en colaboración con la Dra. Isabel Nocito siguiendo la misma metodología descrita en el punto 3.3 de este capítulo.

#### 4.2-Ensayos de Actividad Insecticida.

El insecto utilizado fue *Ceratitis capitata* W (Diptera: Tephritidae). Se empleó material de cría en el laboratorio. Los adultos se criaron en jaulas de acrílico transparente de 40 x 30 x 30 cm en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humedad relativa ( $60 \pm 5\%$ ) y fotoperíodo (14:10 h) y se alimentaron con levadura de cerveza en polvo y azúcar en una proporción de 1:3 (Fig. 28A y C). Se emplearon frutas artificiales para la oviposición de las hembras (Fig.26B) y se les proveyó agua en recipientes de vidrio con esponjas embebidas (Greene y col., 1976).

La cría de larvas se realizó a partir de la recolección de huevos de la fruta artificial, preparando con ellos una suspensión con agua destilada estéril para su remoción y posterior acopio. Finalmente se los ubicó en bandejas plásticas con dieta artificial a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y 60 % HR, para que ocurriera la eclosión. Las larvas neonatas se colectaron bajo la lupa con pincel de pelo de marta N° 000, para la realización de bioensayos.

La dieta artificial de larvas estuvo compuesta por: zanahorias trituradas o ralladas, harina de maíz, azúcar refinada común (sacarosa), levadura de cerveza (marca Virgen, CALSA, Argentina), benzoato de sodio, nipagin y ácido clorhídrico (Terán, 1977).

Luego de la limpieza mensual de jaulas, se renovó la cría a partir de cajas de vidrio con puparios en el interior de las jaulas.

##### 4.2.1-Bioensayos.

La evaluación de los extractos de *C. tweedii* se realizó mediante la exposición de larvas al alimento tratado y por exposición de moscas en cajas con papel de filtro impregnado con los extractos.

En los bioensayos realizados en esta tesis se empleó, como parámetro de efecto letal, la mortalidad donde el valor observado se corrige por mortalidad del control a través de la fórmula de Abbott, obteniendo la mortalidad corregida:

$$\text{Mc(\%)}: \frac{\text{Mort. Tratado (\%)} - \text{Mort. Control (\%)}}{100 - \text{Mort. Control (\%)}} \times 100$$

Como parámetro de efecto subletal se empleó la demora en el desarrollo estimando el tiempo de pupariación medio (TP<sub>50</sub>). Este indica el tiempo (expresado en días) que tarda en alcanzar el estado pupal el 50% de los individuos de la población para un tratamiento dado.



**Figura 28:** Cría de *C. capitata*: **A:** Cría de adultos; **B:** Fruta artificial con moscas oviponiendo; **C:** Adultos con su alimento; **D:** Unidad muestral: Frasco pequeño con dieta impregnada dentro de un recipiente de mayor tamaño. En la parte central del círculo se observan dos puparios de *C. capitata* en la arena.

#### 4.2.2-Ensayo de exposición a alimento tratado (EAT):

Se realizó la impregnación de la dieta con distintas soluciones alcohólicas de los extractos a ensayar. Se utilizó un control consistente en dieta impregnada únicamente con etanol. Luego de evaporar 48 horas el solvente, se incorporaron diez larvas neonatas por repetición manteniéndolas en cámara de cría a  $25 \pm 1$  °C y  $60 \pm 5$  % HR y oscuridad (Bado y col., 2004).

La unidad muestral estuvo representada por un recipiente de plástico de 60 ml con 10 g de dieta artificial impregnada con 1 ml de una solución alcohólica del producto a evaluar (Fig.28D). El recipiente plástico, a su vez fue colocado dentro de otro recipiente de plástico cilíndrico de 10 cm de altura y 8.5 de diámetro, conteniendo arena esterilizada como sustrato para la pupariación. Los recipientes se dispusieron aleatoriamente en la cámara de cría. Las observaciones se realizaron a diario durante los 25 días de ensayo. Se contabilizaron la cantidad de puparios emergidos y posteriormente adultos, con el fin de evaluar la mortalidad en



cada etapa de su ciclo biológico, las demoras en el desarrollo, tiempo de pupariación ( $TP_{50}$ ) y la presencia de alteraciones morfológicas.

#### *4.2.3-Ensayo de exposición en papel de filtro impregnado (EPFI):*

Se impregnó papel de filtro Whatman N° 1 ubicado en el fondo de recipientes plásticos transparentes (10 cm de altura por 8,5 cm de diámetro), con un mililitro de cada extracto re-suspendido en etanol 96°, para una concentración de 500ppm. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Luego de una hora de evaporado el solvente, se incorporaron diez adultos recién emergidos manteniéndolos en cámara de cría a  $25 \pm 1$  °C y  $60 \pm 5$  % HR, registrando la mortalidad cada hora, durante las primeras 5 horas; la última observación se realizó a las 24 hs (Park y col., 2003). Los recipientes fueron distribuidos de forma aleatoria, utilizándose como control papel impregnado en etanol.

#### *4.2.4-Análisis Estadístico.*

Se evaluaron efectos letales como mortalidad pupal, calculada como el porcentaje de larvas neonatas que llegaron a formar puparios en los tratamientos con respecto al control. Estos se analizaron mediante un análisis estadístico de la varianza ANOVA y el test de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ) (Norman y Steiner, 1996). Los efectos subletales, como el tiempo de pupariación medio ( $TP_{50}$ ), se evaluaron por el método Probit (Finney, 1971).

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de la Cátedra de Zoología Agrícola en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, en colaboración con la Ing. Agr. Dra. Sandra Clemente.

### *5-Characterización Fitoquímica de los extractos bioactivos de *Castela tweedii*.*

#### *5.1-Cromatografía en capa delgada (CCD).*

Las CCD fueron realizadas empleando como fase estacionaria (FE) cromatofolios de sílica gel 60 (Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; Merck Labs., Alemania) o cromatofolios de celulosa Polygram Cel 300 UV 254.

Las fases móviles (FM) empleadas cuando se usó sílica gel como fase estacionaria fueron las siguientes:

- Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua (10:1,1:1,1:2,6)
- Acetato de etilo: Metanol: Agua (77:15:8)
- Acetato de etilo: Metanol (95:5)
- Benceno: Acetato de etilo (70:30)
- Cloroformo: Metanol (95:5)
- Cloroformo: Metanol (90:10)

- Cloroformo: Dietilamina (90:10)
- Cloroformo: Ácido acético: Etanol: Agua (60:32:12:8)
- Diclorometano: Metanol (95:5)
- Diclorometano: Metanol (90:10)
- Formiato de etilo: Tolueno: Ácido fórmico: Metanol (20:20:10:10)
- Hexano: Acetato de etilo: Ácido fórmico (75:25:1)
- Hexano: Acetato de etilo (90:10)
- Hexano: Acetato de etilo (50:50)
- Tolueno: Éter (70:30)
- Tolueno: Éter (50:50)
- Tolueno: Éter (50:50), (Saturado en ácido acético 10% V/V)
- Tolueno: Acetato de etilo: Dieteilamina (70:20:10)
- Tolueno: Acetato de etilo (70:30)
- Tolueno: Acetato de etilo (90:10)

Las FM empleadas cuando se usó celulosa como FE fueron las siguientes:

- Ácido acético 6% V/V
- Ácido acético 15% V/V
- Ácido acético 40% V/V

Se utilizaron los siguientes patrones de referencia comerciales:

- Cumarinas: Escopoletina (Sigma<sup>®</sup>), umbeliferona (Sigma<sup>®</sup>), esculetina (Sigma<sup>®</sup>), esculina (Sigma<sup>®</sup>) al 0,1% P/V en metanol.
- Flavonoides: Genkwanina (Extrasynthese<sup>®</sup>), luteolina (Extrasynthese<sup>®</sup>), apigenina (Extrasynthese<sup>®</sup>) 0,05% P/V en metanol, rutina (Sigma<sup>®</sup>), quercitrina (Sigma<sup>®</sup>), quercetina (Sigma<sup>®</sup>), isoquercitrina (Sigma<sup>®</sup>), hiperósido (Sigma<sup>®</sup>), kaempferina (Sigma<sup>®</sup>), kaenferol (Sigma<sup>®</sup>), quercetina metil éter (Sigma<sup>®</sup>) 0,05% P/V en metanol.
- Cuasina (Extrasynthese<sup>®</sup>) 0,1% P/V en metanol.
- Alcaloides: Quinina (Extrasynthese<sup>®</sup>), quinidina (Extrasynthese<sup>®</sup>), yohimbina (Extrasynthese<sup>®</sup>) 0,05% P/V en metanol.
- Ácido clorogénico (Sigma<sup>®</sup>), ácido caféico (Carl Roth<sup>®</sup>) al 0,1% P/V en metanol.
- Ácido gálico (Extrasynthese<sup>®</sup>) 0,05% P/V en metanol
- $\beta$ -sitoesterol (Sigma<sup>®</sup>), ácido oleanólico (Sigma<sup>®</sup>), ácido ursólico (Sigma<sup>®</sup>) al 0,1% P/V en cloruro de metileno.

Una vez realizadas las corridas cromatográficas las placas fueron observadas a luz visible, bajo luz UV de 254nm y 365nm y reveladas con los siguientes reactivos reveladores:

- Reactivo de Productos Naturales - Polietilenglicol (RPN-PEG): solución de 2-aminoetil difenilborinato al 1 % en metanol y polietilenglicol al 5 %.
- Anisaldehído sulfúrico (AS): 0,5 mL de anisaldehído mezclado con 10 mL de ácido acético glacial, seguido del agregado de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Reactivo de Bortränger (KOH): hidróxido de potasio etanólico 10 % P/V
- Tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 10% P/V en agua.
- Reactivo de Dragendorff: solución stock: (a) 0,85 g de nitrato básico de bismuto en 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. (b) 8 g de ioduro de potasio en 30 mL de agua. Se mezclan 1 mL de la solución stock con 2 mL de ácido acético glacial y 10 mL de agua.

### 5.2-Cromatografía en columna (CC).

700 mg de extracto de madera diclorometánico de *C. tweedii* fue fraccionado por cromatografía en columna a presión hidrostática. El extracto seco se re-disolvió en 2 mL de tolueno y se sembró en una columna de vidrio de 45 cm de altura por 3 cm de diámetro. Se utilizó como FE silica gel 60, 70-230 Mesh ASTM (Machery-Nagel®). Se eluyó con un gradiente escalonado de polaridad creciente de los siguientes solventes: Tolueno, éter, metanol, agua. Se recogieron fracciones de 50 ml que se fueron concentrando y re-disolviendo en metanol. Las fracciones obtenidas (60 fracciones) fueron evaluadas mediante CCD utilizando las FM descriptas en el punto 5.1.de este capítulo. Aquellas fracciones que presentaron perfiles cromatográficos similares fueron reunidas, dando 15 fracciones enumeradas: fracción 1, 2, 3, 4/5, 6/11, 12/13, 14, 15/16, 17/19, 20/25, 26/29, 30/33, 34/48, 49/60 y 61/62. Se continuó con el análisis de estas fracciones por CCD frente a distintos patrones de referencia comerciales.

### 5.3-Cromatografía en fase Gaseosa (CG)

La fracción 20/25 obtenida por CC fue analizada mediante cromatografía en fase gaseosa (CG) en un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3400CX. Se utilizó una columna de 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (DB5, J&W Scientific) de 30 m x 0.25 mm de diámetro y 0.25 $\mu$  de espesor de FE; con detector FID a 300°C. Temperatura de inyección 300°C, temperatura inicial de la columna: 200°C, tiempo inicial 1 minuto, aumentando 15°C/min. hasta los 290°C, tiempo final 23 min. Relación de Split: 1:90. Gas portador:  $\text{N}_2$ , a una velocidad de 1 ml/min. La identificación se realizó por comparación del tiempo de retención entre el testigo de  $\beta$ -sitosterol y las diferentes fracciones analizadas.

#### 5.4-Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Las cromatografías se realizaron en un equipo Varian 9012 con un detector UV – visible Varian 9050 y un detector con arreglo de fotodiodos Varian Polycrom 9065. La detección UV se realizó a 325 nm y 254 nm. Se utilizó una columna C18 Luna 5  $\mu$ m (250 nm x 4.6 nm di). Se emplearon dos sistemas de solventes:

Sistema I: FM binaria compuesta por los solventes A: H<sub>2</sub>O-AcOH (98:2) y B: MeOH-AcOH (98:2). Gradiente: 15% B a 40% B, 30 min; 40% B a 75% B, 10min; 75% B a 85% B, 5min. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l y el flujo de 1.2 mL/ min.

Sistema II: FM compuesta por los solventes A: H<sub>2</sub>O-TFA (99,5:0,5) y B: acetonitrilo 100%. Gradiente: 10%B a 20%B, 10min; 20% B a 22% B, 5 min; 22% B a 25% B, 15 min; 25% B a 30% B, 5 min; 30% B a 30% B, 20min. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l y el flujo de 1.2 mL/ min.

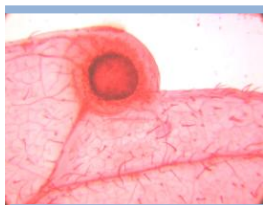
Para la preparación de las FM se emplearon solventes Sintorgan<sup>®</sup> grado HPLC. Las soluciones de los extractos y fracciones se inyectaron a través de filtros Millipore SJHVO 13NS, 13 nm de diámetro. Los extractos se sembraron en una concentración de 5mg/mL y los patrones de referencia comerciales a 0,1mg/mL en metanol. Los patrones de referencia comerciales fueron:

- Flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos: Rutina, isoquercitrina, luteolina, ácido clorogénico, apigenina, genkwanina, ácido caféico, ácido vainílico, hiperósido y quercetina.
- Cumarinas: Esculetina, esculina, escopoletina y umbeliferona.
- Taninos: Ácido gálico, galicina, catequina, ácido elágico, epigallocatequina, epigallocatequin galato y epicatequin galato.
- Alcaloides: Harmano, norharmano.
- Cuasinoïdes: Cuasina, isocuasina y neocuasina.

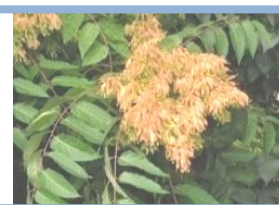
Se inyectaron en primer lugar los testigos de referencia comerciales correspondientes seguidos inmediatamente por los extractos, bajo las mismas condiciones cromatográficas.

#### 5.5-Extracción Líquido-líquido.

5 g del extracto metanólico de hojas fueron re-suspendidos en 150mL de agua destilada, el extracto obtenido se particionó en un extractor líquido-líquido tipo Kutscher Steudel, usando acetato de etilo como solvente de extracción. Se obtuvieron dos fracciones: fracción hoja MeOH/AcoEt (H<sub>AcoEt</sub>) y una fracción acuosa residual (H<sub>acuosa</sub>). Ambas fracciones fueron analizados por CCD y CLAE acoplada a detector UV/DAD con arreglo de fotoiodos, utilizando las mismas condiciones cromatográficas detalladas en el punto 5.3 de este capítulo.



## *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle.



***Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, J.Wash. Acad.Sci.6 (14):495.1916.**

*Toxicodendron altissima* Mill., *Gard. Dict.* (ed.8)10.1768; *Rhus senensis* Ellis, en Houttuyn., *Natn. Hist. II* (2): 212. 1774; *Ailanthus glandulosa* Desf., *Men. Acad. Sci.* (Paris) 1786:265, tab.8.1788; *Ailanthus procera* Salisb., *Prodr.*:171. 1796; *Pongelion glandulosum* (Desf.) Pierre., *Fl. Forest. Cochinch.* 4, pl. 294. 1893; *Ailanthus cacodendron* (Ehrh.) Schinz et Tell., *Men. Soc. Sci. Nat. Cherbourg.* 38:679.1912; *Pongelion cacodendron* (Ehrh) Farwell., *Am. Midl. Nat.* 12:67. 1930; *Ailanthus* (Buc'hoz) Barkley, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 24:264.1937.

Árbol de gran porte, hasta 8 m de altura, a menudo dioico, de corteza grisácea y brillante (Fig. 30A, F). Hojas caducas, imparipinadas, de hasta 80 cm de longitud; folíolos 10-25, ovado-lanceolados, de 4-15 x 5 cm, provistos de glándulas a menudo 1-3 lobadas a cada lado, hacia la base del folíolo, de borde entero, ápice acuminado, truncado o redondeado (Fig. 30B; Fig. 33A, B). Flores poco conspicuas, verdosas, 5-meras, agrupadas en panojas terminales conspicuas; con androceo diplostémono. Sámara oblonga de 3-5 x 0,5-1,5 cm, con parte seminífera central a ala hialina de color castaño (Fig. 30C) (Xifreda y Seo, 2006).

**NOMBRES VULGARES:** "Ailanto", "Árbol del Cielo" o "Árbol de los Dioses".

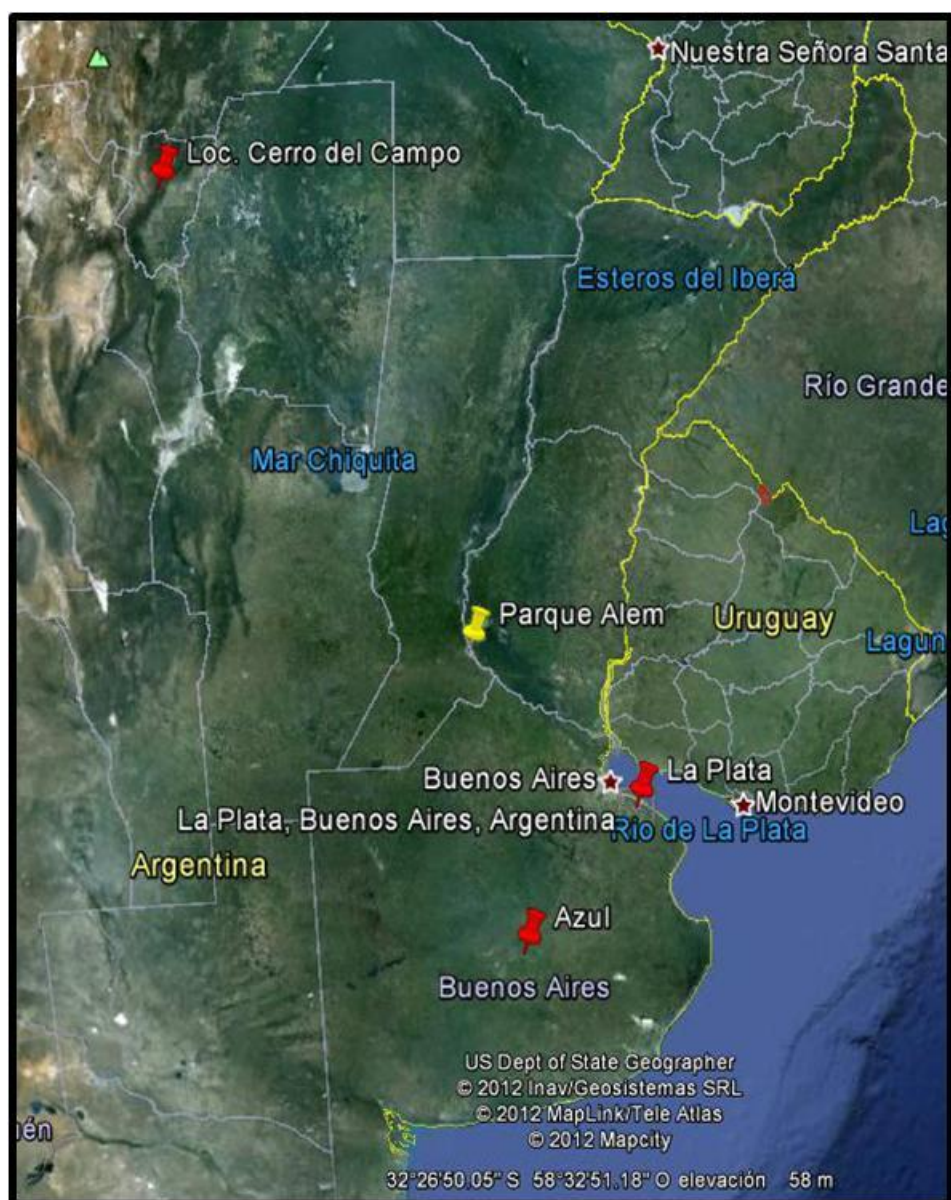
### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.**

Especie introducida, originaria de China, cultivada como ornamental en calles y parques, en Buenos Aires, La Plata y Tucumán; crece en ambientes antrópicamente modificados, escapado de cultivos en grietas de veredas, entre los 0 y 500 m sobre el nivel del mar (Fig. 29), (Xifreda y Seo, 2006).

### **USO VERNÁCULO.**

La corteza se utiliza como antiespasmódica y antiparasitaria en animales. En China la corteza se utiliza para el tratamiento de resfríos (De Feo y col., 2003), la disentería y otros problemas intestinales, la tintura de la corteza de raíz contra palpitations cardíacas, asma y epilepsia (Moussalli, 1939; Hu, 1979). En Europa su uso es ornamental (Grieve, 1996). Las hojas se usan como astringentes en lociones para la seborrea (Howard y col., 2004). Además, es utilizada con fines agronómicos para controlar distintas pestes en agricultura (Heisey, 1990).





**Figura 29: Distribución geográfica de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.**    ▲ Sitios de colección;    ▲ Citas de herbarios y bibliográficas.

---

### **CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

#### **HOJAS.**

Hojas caducas, compuestas imparipinnadas, de hasta 80 cm de longitud; folíolos 10 a 25, ovado-lanceolados, de 4 a 15 x 5 cm, provistos de glándulas a menudo 1 a 3 lobadas a cada lado, hacia la base de la hoja, de borde entero, ápice acuminado, truncado o redondeado (Fig. 30B; Fig. 33A, B).

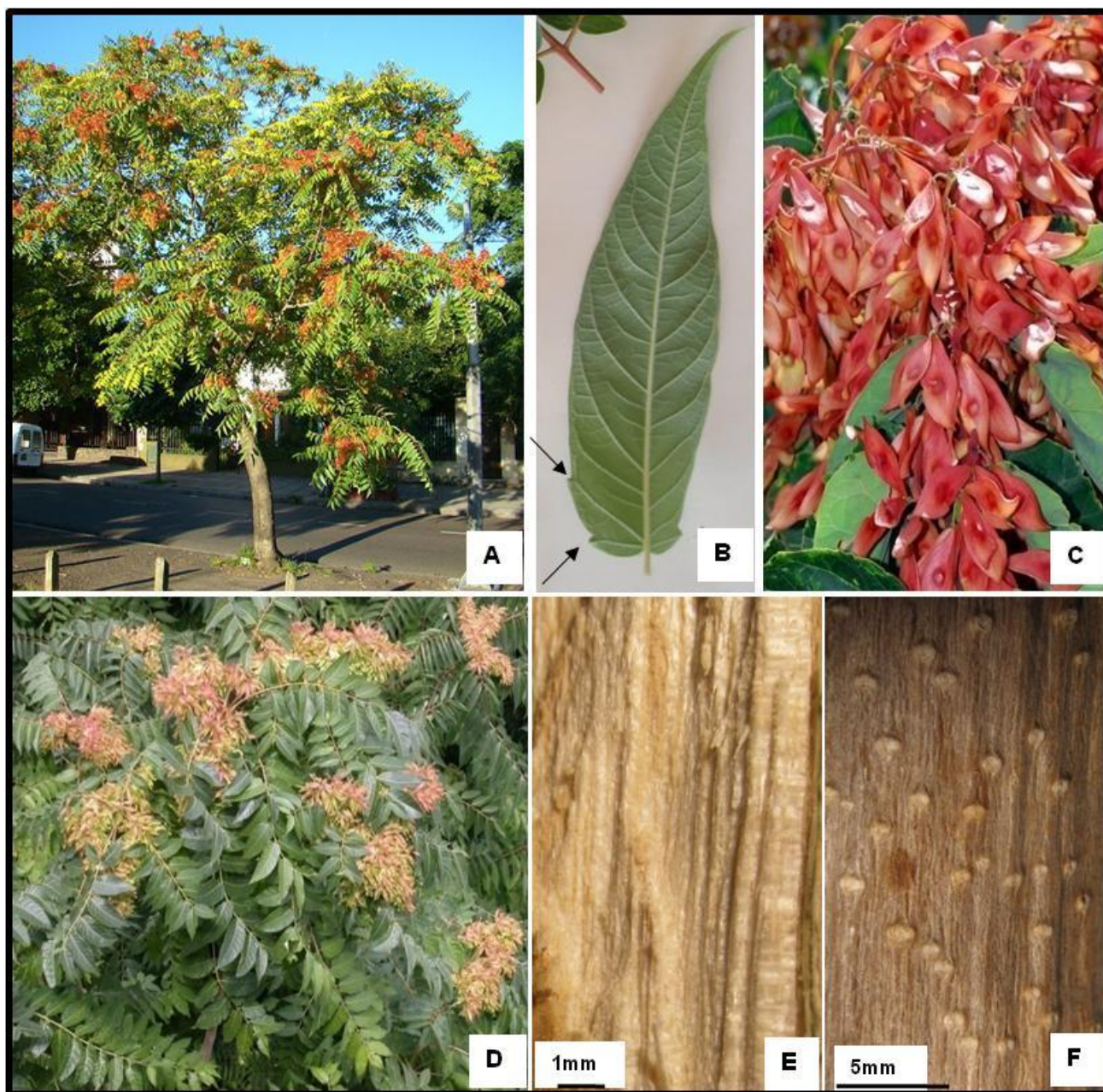
#### **CORTEZA.**

La superficie externa de la corteza de ramas jóvenes es de color castaño rojizo con abundantes y pequeñas lenticelas color amarillo pálido (Fig. 30F). En ramas laterales desarrolladas el color se torna pardo grisáceo con lenticelas transversales prominentes en la superficie. Posee fractura entera, olor característico y sabor ligeramente amargo.

#### **LEÑO.**

En sección transversal el leño es de color blanquecino, algo brillante (Fig. 30E), con anillos de crecimiento medianamente visibles, delimitados por una franja pardusca. La porosidad es anular. Existe escasa diferenciación entre albura y duramen, siendo éste último de color castaño.





**Figura 30: Exomorfología de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.** A: Ejemplar adulto; B: Envés del foliolo, ubicación de las glándulas; C: Detalle de frutos; D: Ramas con infrutescencias; E: Leño; F: Detalle de la corteza.

---

## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

---

### HOJA.

#### *Lámina del folíolo en vista superficial.*

*Arquitectura foliolar:* la venación es camptódroma broquidódroma. Posee de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinnadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres. Las areolas son cuadrangulares y pentagonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas, rectas y curvas. La red vascular es de densidad intermedia (Fig. 31A; Fig. 33C).

*Epidermis adaxial:* con cutícula gruesa y estriada, las células son poligonales de paredes anticlinales rectas. No se observan estomas (Fig. 31B; Fig. 33D). Presenta tricomas simples uni y pluricelulares, y glandulares de pie y cabeza pluricelular (Fig. 32H; Fig. 33 F, G).

*Epidermis abaxial:* con cutícula gruesa y estriada (Fig. 31F, H), las células son poligonales con paredes anticlinales rectas, de menor tamaño que las de la epidermis adaxial. Se observan estomas del tipo anomocítico al mismo nivel que las restantes células epidérmicas (Fig. 31 C, F, G, H; Fig. 33E). Se destacan glándulas pluricelulares, rodeadas de gran cantidad de drusas de oxalato de calcio, en cada diente de la base foliolar (Fig. 31 D, E). Presenta el mismo tipo de tricomas simples y glandulares que la epidermis adaxial (Fig. 31 G; Fig. 33F, G).

#### *Lámina del folíolo en corte transversal*

*Epidermis adaxial:* uniestratificada de células grandes. Cutícula gruesa y estriada (Fig. 32B). El folíolo es hipoestomático. El mesófilo es de estructura dorsiventral con una hilera de parénquima en empalizada (Fig. 32 B; Fig. 33H, K). Se observan drusas de oxalato de calcio en el parénquima esponjoso rodeando el nervio medio. En posición subepidérmica, este se halla reforzado por colénquima del tipo laminar. El nervio medio está constituido por 5-7 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma circular y acompañados por una vaina conspicua de fibras blandas (Fig. 32 A; Fig. 33 H). Los haces de los nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 33 K).

La glándula pluricelular en corte transversal, se encuentra rodeada por una epidermis unicelular y se pueden diferenciar distintos tipos de parénquima (Fig. 32 E; Fig. 33I, J): el parénquima secretor, de células con citoplasma denso (Fig. 32F), y rodeando a este un parénquima de transición de células elongadas (Fig. 33J). Se observa la presencia de un poro en la epidermis abaxial (Fig. 32G).

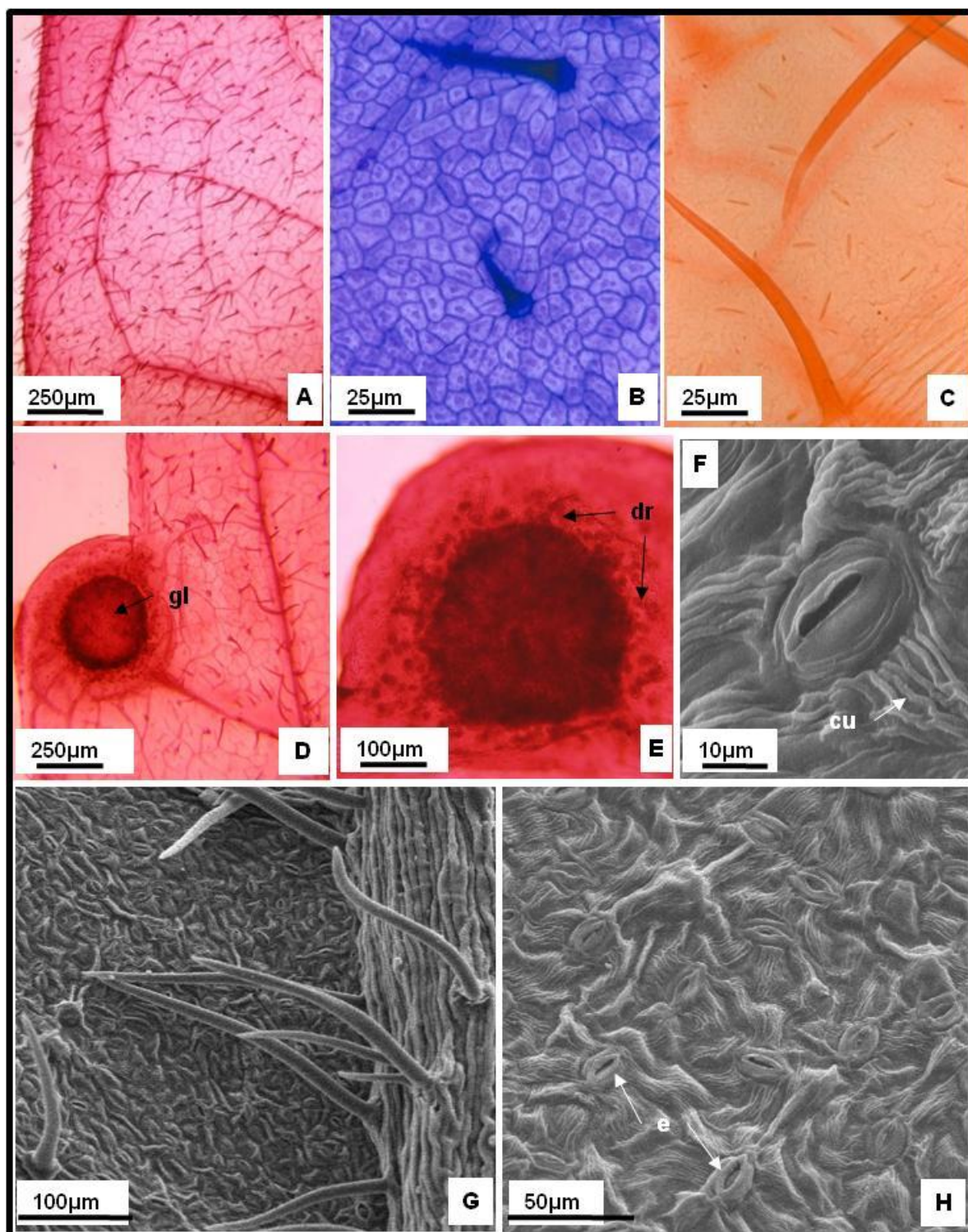
*Epidermis abaxial:* uniestratificada con cutícula gruesa y estriada (Fig. 32B).

***PECIOLULO.***

En sección transversal es de contorno plano convexo con dos expansiones laterales (Fig. 33L). La epidermis es uniestratificada, con cutícula gruesa y pelos simples uni y pluricelulares. En posición subepidérmica se observan 3 a 4 hileras de colénquima laminar. El sistema vascular está constituido por 15 a 18 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma circular, cada haz presenta un casquete de fibras blandas. Se observan gran cantidad de drusas de oxalato de calcio en el parénquima y la médula (Fig.33 L).

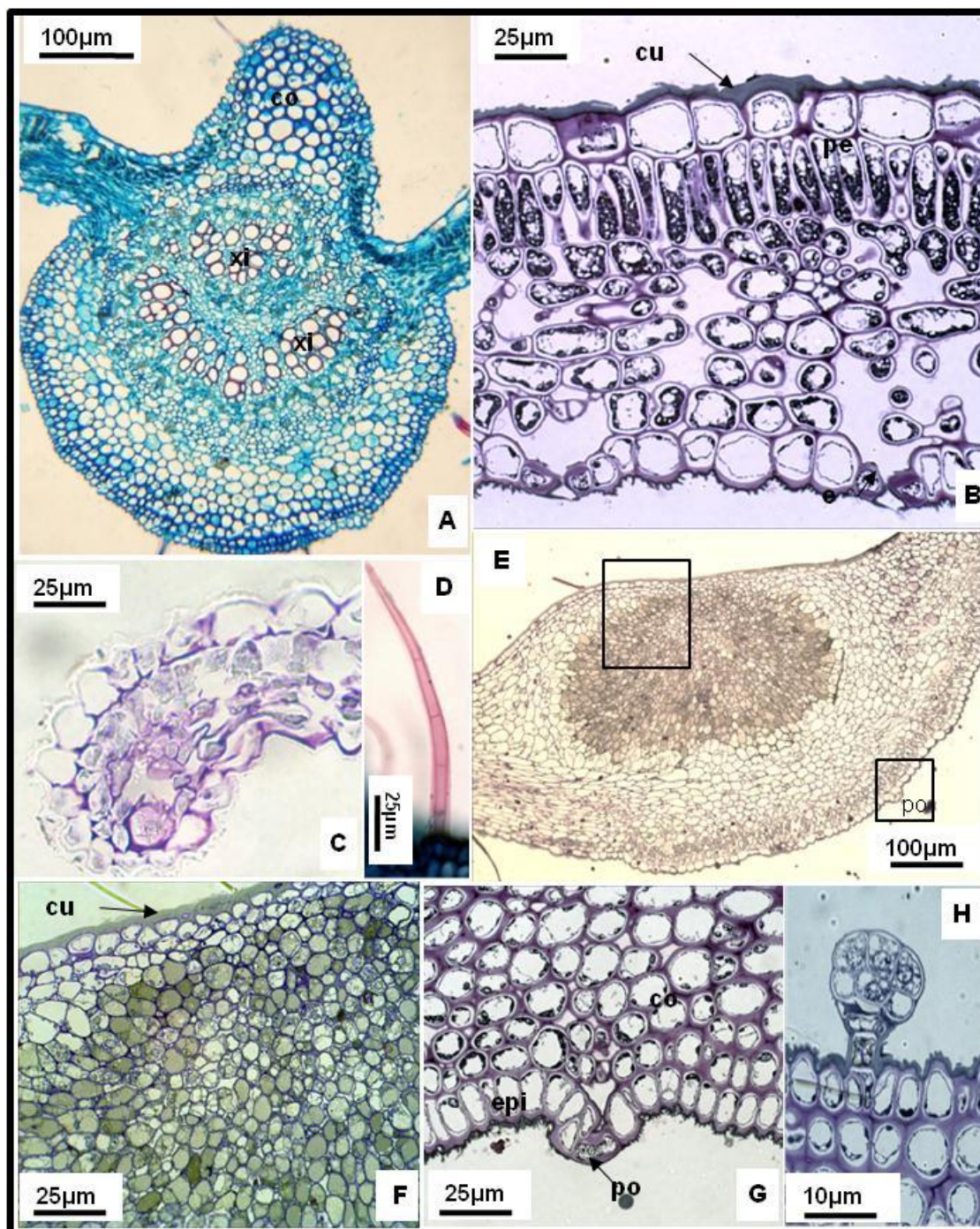
Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico para las hojas se expresan en la Tabla 12.





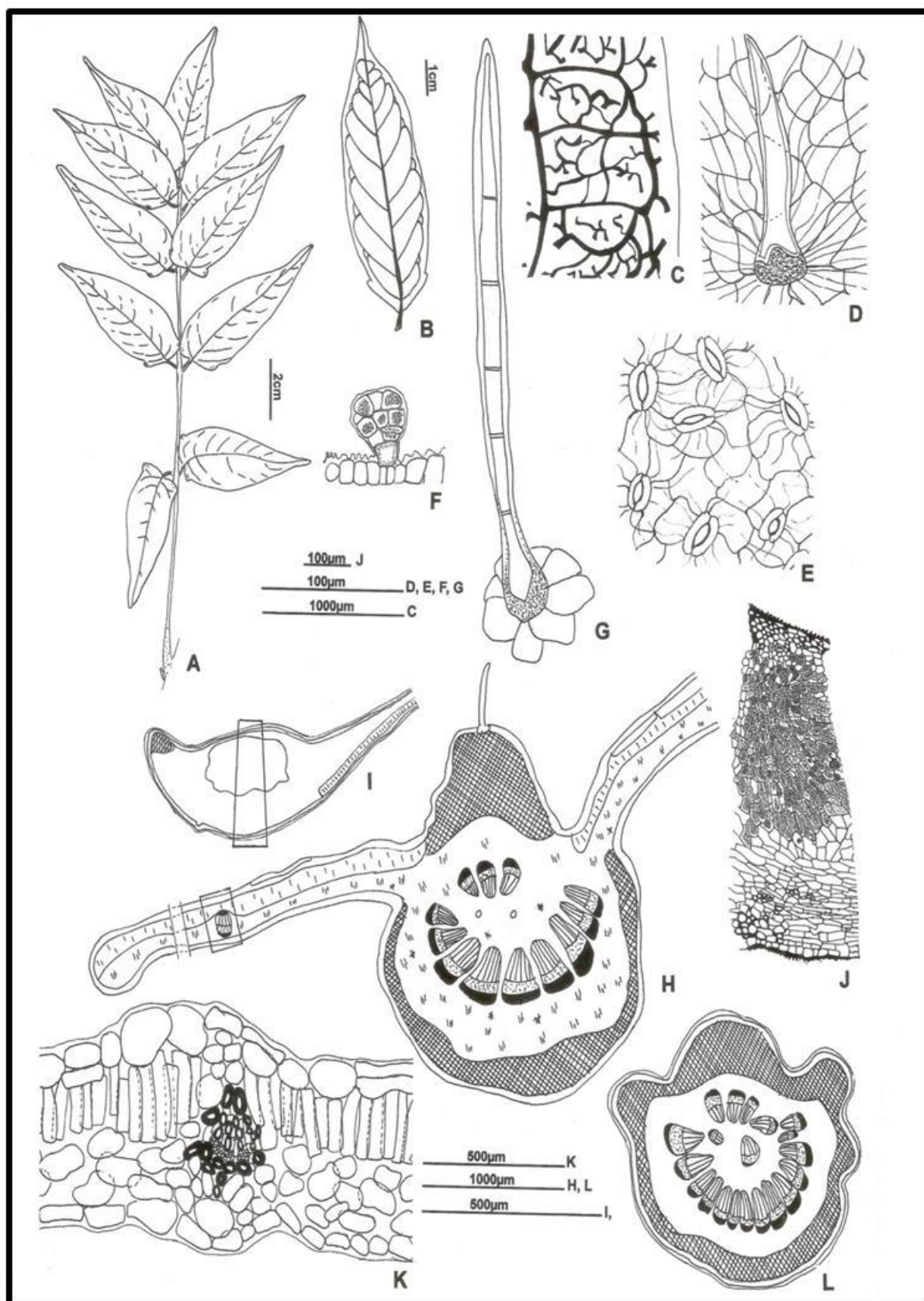
**Figura 31 : Fotomicrografía de foliolo de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.** Vista superficial. **A:** Arquitectura foliolar; **B:** Epidermis adaxial; **C:** Epidermis abaxial; **D:** Diente en la base foliolar; **E:** Detalle de la glándula; **F-H:** MEB, epidermis abaxial; **F:** Detalle de un estoma; **cu:** Cutícula estriada; **dr:** Drusas; **e:** Estoma; **gl:** Glándula.





**Figura 32 : Fotomicrografía de folíolo de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.**  
**A-H:** Sección transversal. **A:** Nervio medio; **B:** Semilimbo; **C:** Borde del semilimbo; **D:** Pelo simple pluricelular; **E:** Glándula nectarífera en el diente en la base foliolar; **F:** Detalle de lo indicado en **E**, tejido secretor; **G:** Detalle de lo marcado en **E**, poro; **H:** Pelo glandular. **co:** Colénquima; **cu:** Cutícula; **epi:** Epidermis; **po:** Poro; **xi:** Xilema.





**Figura 33: Micrografía de folíolo de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single. A:** Morfología foliar; **B-C:** Arquitectura foliolar: **B:** Aspecto general; **C:** Venación del borde y areolas; **D, E y G:** Epidermis en vista superficial, **D:** adaxial; **E:** abaxial; **F:** Tricoma glandular; **G:** Tricoma simple pluricelular; **H-L:** Sección transversal, **H:** Nervio medio; **I:** Glándula en la base foliolar; **J:** Detalle de lo indicado en **I**; **K:** Detalle de lo indicado en **H**; **L:** Pecíolo.

## CORTEZA

### *Corteza externa*

Presenta una peridermis constituida por 5-7 capas de súber dispuestas de manera estratificada y discontinua, cada capa de súber se encuentra formada por 15-30 hileras de células suberosas de dimensiones variables y sin tejido floemático intermedio (Fig. 34A, B, C). Las células del súber son de forma poligonal cuadrangular y rectangular en sección transversal, con engrosamiento mediano y heterogéneo en sus paredes celulares, siendo las basales más aplanadas y con mayor depósito de suberina, lo que permite diferenciar las capas entre sí. En superficie, las células suberosas se observan poligonales. La felodermis es única y pluriestratificada.

### *Corteza interna*

En el parénquima floemático se observan numerosos grupos heterogéneos de dimensiones variables de esclerénquima compuesto, que se extienden hasta el floema funcional (Fig. 34A). Éste se encuentra formado por fibras, braquiesclereidas y macroesclereidas (Fig. 34A, D), estas últimas con abundantes cristales poliédricos de oxalato de calcio (Fig. 34E, F, G).

El floema funcional se halla interrumpido por radios 1-5-7 seriados; se observan cavidades secretoras aisladas y dispersas. El parénquima radial se halla constituido por células parenquimáticas procumbentes y erectas, de paredes poco engrosadas y con escasos espacios intercelulares. Posee escasas fibras floemáticas. El parénquima axial contiene drusas de oxalato de calcio.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 12.

## LEÑO

La porosidad es anular uniforme. El crecimiento es anular (Fig. 35A, I). Los vasos son de contorno circular, con placa de perforación simple y puntuaciones intervasculares areoladas alternas con apertura de la puntuación inclusa (Fig. 35A, E-H). Se observan vasos solitarios de gran tamaño y medianos, y múltiples de 2 a 4 de distribución radial y oblicua en el leño temprano. En el leño tardío los vasos son pequeños, geminados, racemiformes y múltiples cortos de 2 a 6, de distribución radial y oblicua (Fig. 35A, I).

Las fibras xilares, traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas presentan paredes laterales medianamente engrosadas; se hallan reunidas en grupos inter-radiales y se aplanan tangencialmente, al final del anillo de crecimiento, en el leño tardío. Las fibras xilares libriformes son fusiformes, de disposición no estratificada con puntuaciones simples.

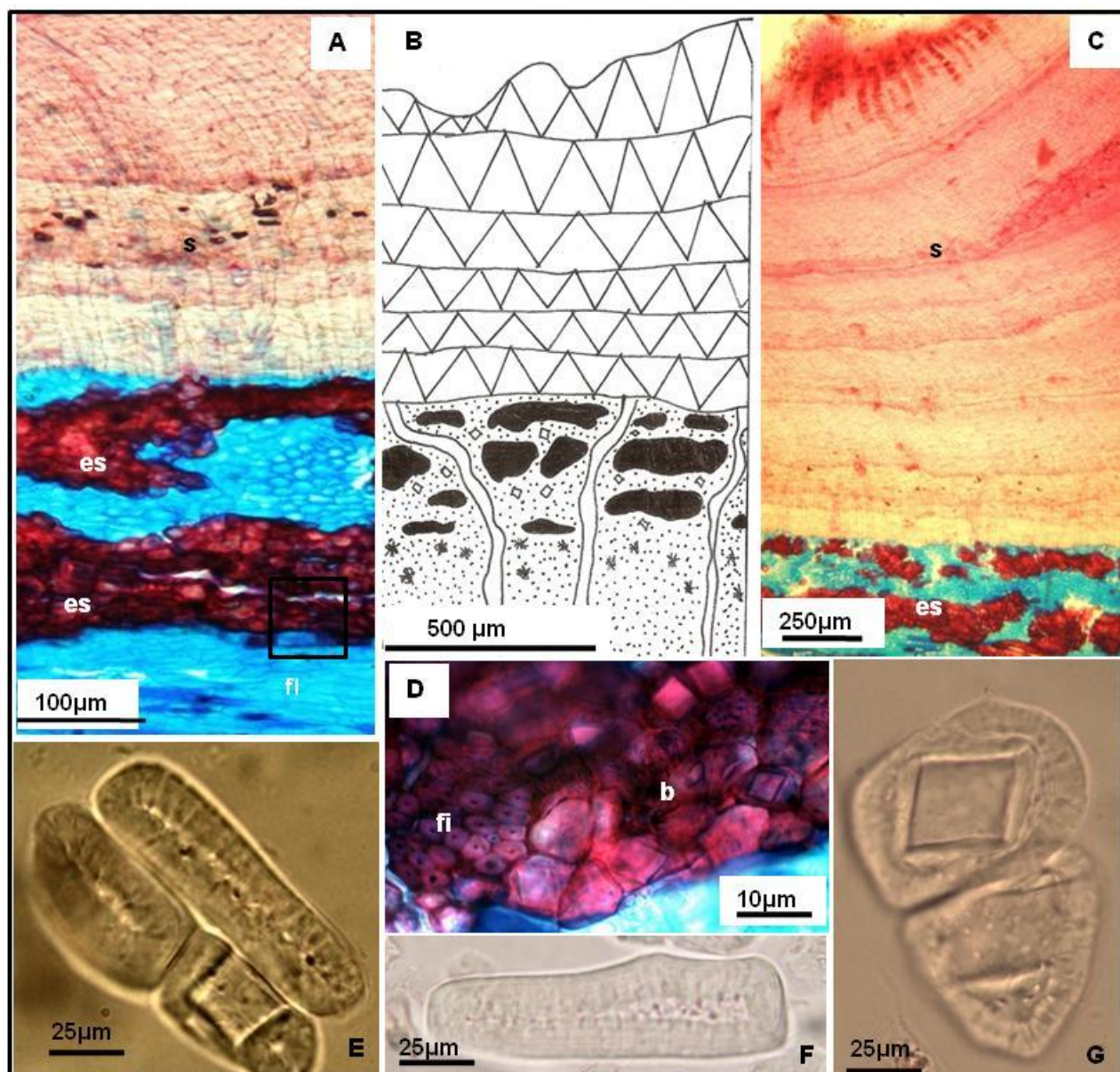
El parénquima xilemático axial es paratraqueal vasicéntrico, levemente aliforme, conformado por 5 a 8 células por banda de parénquima.

Los radios secundarios son heterocelulares no estratificados, uniseriados y más comunes 4 a 10 seriados; con 1 a 4 células erectas en los márgenes de los mismos. Las células radiales no dejan espacios intercelulares y poseen las paredes medianamente engrosadas con puntuaciones simples (Fig. 35B, C).

Se observan aisladas cavidades secretoras (Fig. 35D).

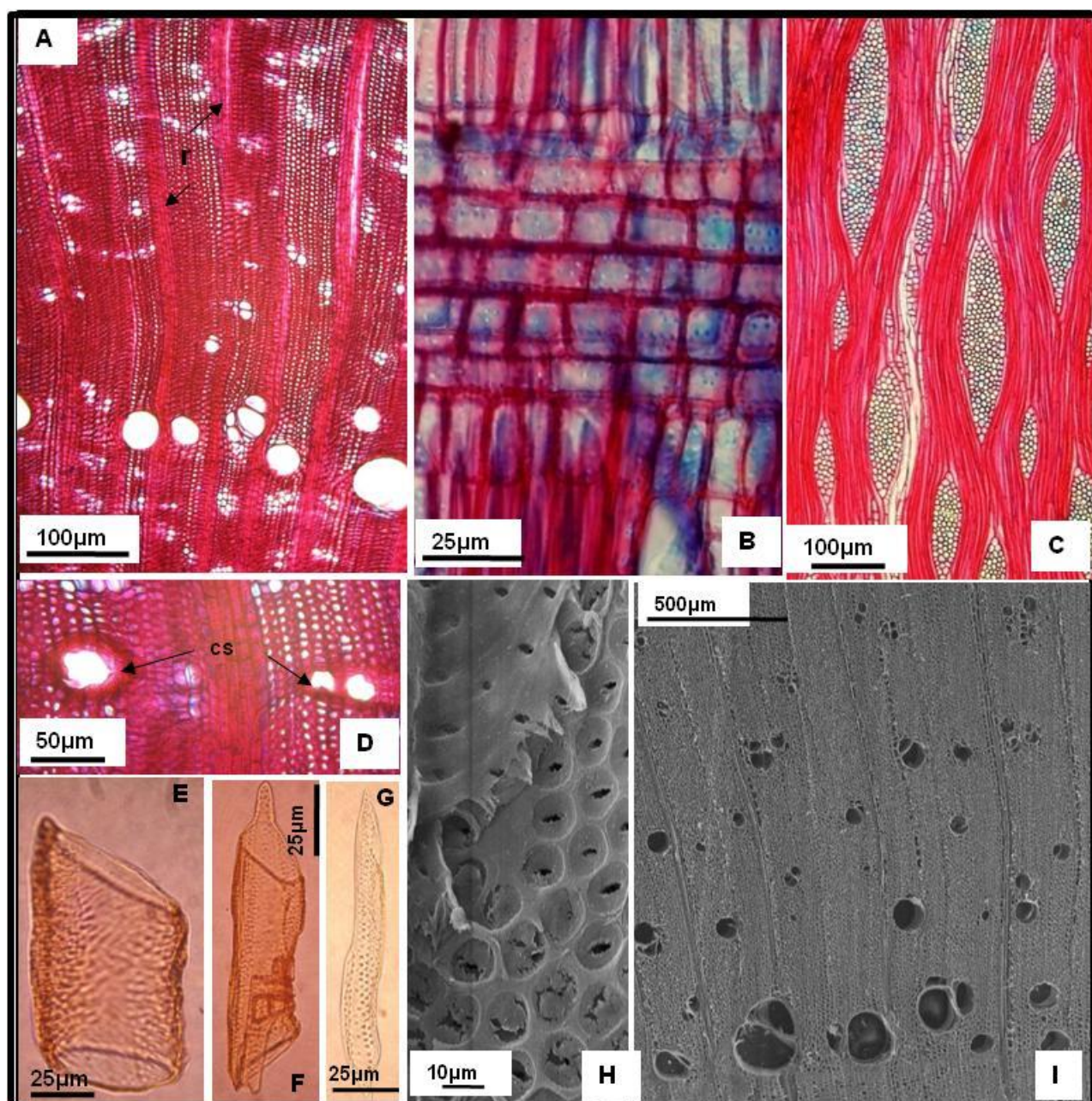
Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 12.





**Figura 34: Fotomicrografía de la corteza de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single. A-D:** Sección transversal; **A:** Vista panorámica; **B:** Representación esquemática; **C:** Corteza externa; **D:** Detalle de la zona indicada en A; **E-G:** Material macerado: **E:** Macro y braquiesclereidas; **F:** Macroesclereida; **G:** Braquiesclereidas con cristales de oxalato de calcio incluidos. **b:** Braquiesclereidas; **es:** Esclerenquima; **fi:** Fibras; **fl:** Floema.





**Figura 35: Fotomicrografía del leño de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.** **A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal radial, radio heterocelular; **C:** Sección longitudinal tangencial; **D:** Sección transversal, cavidades secretoras; **E-G:** Material macerado, miembros del vaso; **H-I:** MEB; **H:** Puntuaciones intervasculares areoladas alternas; **I:** Sección transversal. **cs:** Cavidades secretoras esquizolisigenas; **r:** Radios pluriseriados

Hoja	Índice de estomas		18,1 ± 3,0
	Estomas x mm <sup>2</sup>		227,7 ± 46,5
	Índice de empalizada		8,1±1,7
	Tricomas simples x mm <sup>2</sup>		63,7 ± 15,9
	Longitud de tricomas simples (µm)		277,2 ± 57,2
Corteza	Latitud células de súber en transcorte		10,0±0,1
	Longitud células de súber en transcorte		40,0±1,3
	Diámetro células de. súber		20,0±0,2
	Diámetro braquiesclereidas		40,0±6,6 (31-53)
	Long. Macroesclereidas	Cortas (48%)	56,3 ± 6,6 (40-64)
		Largas (52%)	86,8 ± 19,4 (70-140)
	Long. Fibroesclereidas	Cortas (47%)	422,2 ± 94,4 (328-568)
		Largas (53%)	722,8 ± 80,1 (600-860)
	Long. Fibras no septadas	Cortas (60%)	1234,2 ± 137,2 (980-1400)
		Largas (40%)	1805,7 ± 148,1 (1560- 2060)
Leño	Longitud elementos del vaso		288,7 ± 40,4 (224-360)
	Diámetro elementos del vaso	Primavera	149,4 ± 23,6 (96-184)
		Verano	27,3 ± 6,2 (14-36)
	Longitud fibras no septadas	Cortas (80%)	812,5 ± 62,3 (700-920)
		Largas (20%)	1145,0±176,9 (1000-1400)
	Latitud de fibras		16,1±0,1
	Vaso x mm <sup>2</sup>		25,5 ± 9,2
	Altura de los radios	Unicelulares	5±2
		Pluricelulares	Cortos 11 ± 4 Largos 27 ± 5
	Índice de vulnerabilidad		5,8
	Índice de mesomorfía		1674

**Tabla 12: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.** Los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.

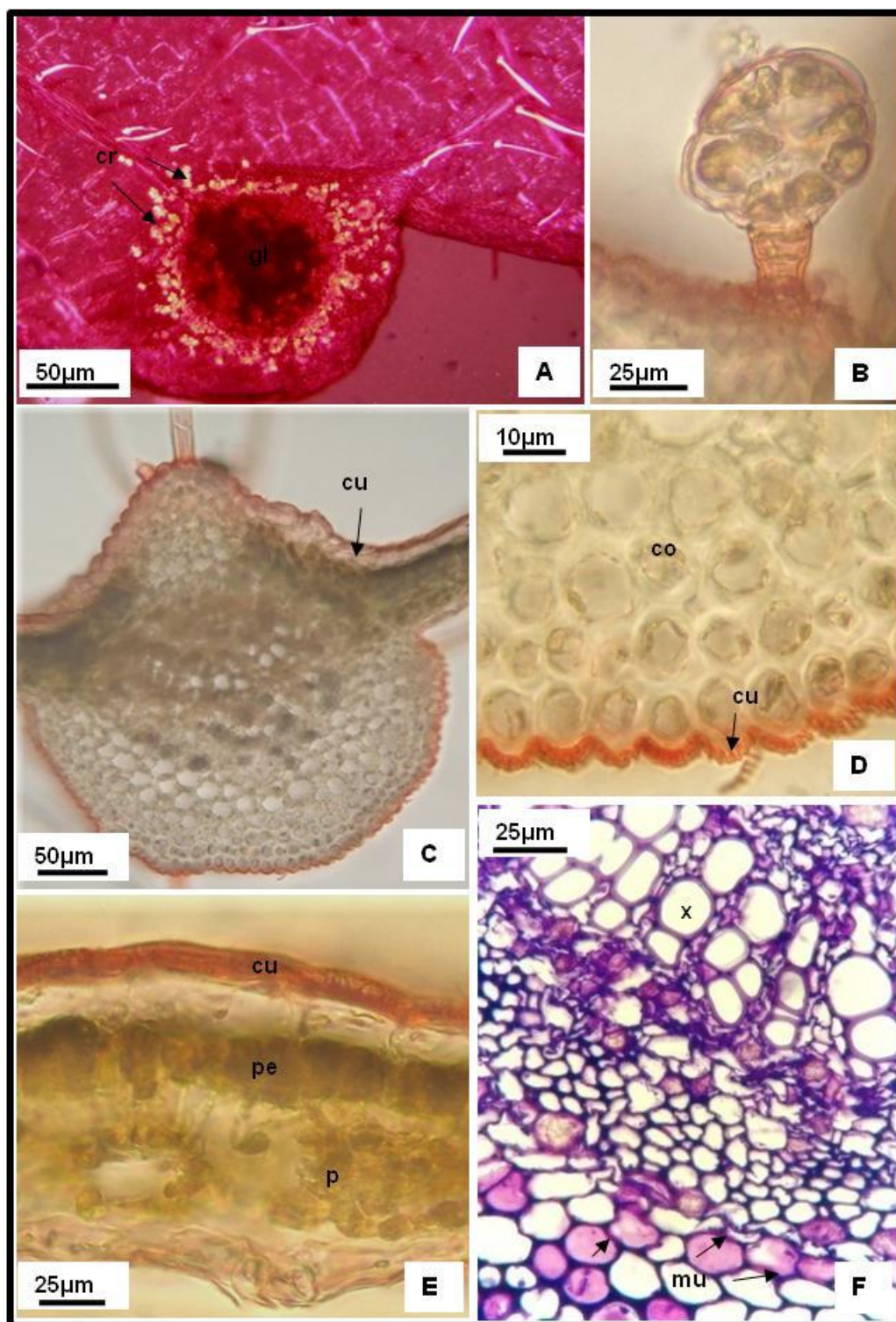
---

### ***ANÁLISIS HISTOQUÍMICO.***

---

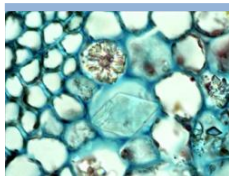
Se observó la presencia de mucílagos en idioblastos del parénquima esponjoso, en cortes transversales de folíolo teñidos con violeta de cresilo (Fig. 36F). La tinción con Sudán IV permitió diferenciar una cutícula estriada sobre ambas epidermis y aceites esenciales en los tricomas glandulares (Fig. 36B-D). La observación bajo luz polarizada permitió detectar gran cantidad de drusas de oxalato de calcio rodeando las glándulas en cada uno de los dientes de la base foliolar, así como también en el parénquima esponjoso de los folíolos (Fig. 36A).



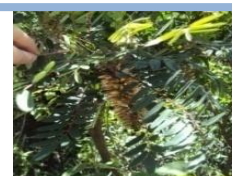


**Figura 36: Análisis Histoquímico *Ailanthus altissima* (Mill.) Single.** **A:** Vista superficial de la glándula en la base foliolar; **B-F:** Sección transversal del foliolo; **B:** Pelo glandular, tinción con Sudán IV; **C y D:** Nervio medio, tinción con Sudán IV; **D:** Detalle de cutícula estriada; **E:** Sección transversal del semilimbo, tinción con Sudán IV y solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%; **F:** Tinción con Violeta de cresilo. **co:** Colénquima; **cu:** Cutícula, **cr:** Cristales de oxalato de calcio; **gl:** Glándula; **p:** Parénquima esponjoso; **pe:** Parénquima en empalizada; **mu:** Mucilagos; **x:** Xilema





## *Alvaradoa subovata* Cronquist



### ***Alvaradoa subovata* Cronquist. (Brittonia 5 (2):134, 1944).**

*Alvaradoa amorphoides* var. *puberulenta* Monach. *Lillioa* 8:407. 1942. *Alvaradoa subovata* var. *puberulenta* (Monach.) Cronquist, *Brittonia* 5:134. 1944; *Alvaradoa puberulenta* (Monach.) Sleumer, *Lilloa* 26: 170-171. 1953; *Alvaradoa amorphoides* auct. Non Liebm., Griseb., *Symb. fl. Argent.*: 77. 1879.

Arboles pequeños o arbustos, muy vistosos por su floración roja y amarilla, de 3 a 6 m de altura, con tallo delgado (Fig. 38A, D). Hojas compuestas, alternas, imparipinadas, con 16-24 folíolos oblongos, de 2-4 x 0,4-1 cm, de borde entero, alternos (Fig. 38B; Fig. 40A, B). Flores estaminadas en racimos péndulos multifloros, terminales o axilares; con 5 sépalos, ovado-elípticos, de 2 x 9,5 mm, soldados en el tercio inferior, exteriormente pubescentes, pétalos 5, filiformes, de 2-2,5 mm de largo, glabros, estambres 5, de 4 mm de largo, exertos; filamentos pilosos en la parte inferior, con anteras bitecas. Disco pentalobulado. Flores pistiladas en racimos péndulos, densifloros, axilares o terminales; con 5 sépalos similares a las flores estaminadas, sin pétalos, ovario inserto sobre un pequeño disco, estilos 3, recurvados. Cápsula elíptico-lanceolada, uniseminada, amarillenta, de 15x5 mm (Fig. 38B). Semilla alargada de cerca de 6 x2 mm, oscura. Granos de polen prolatos ovoides, trilobados en vista polar, tricolporoidados, foso aperturados, ectexina tectada, tectum de superficie equinada, con espínulas y perforaciones (Xifreda y Seo, 2006).

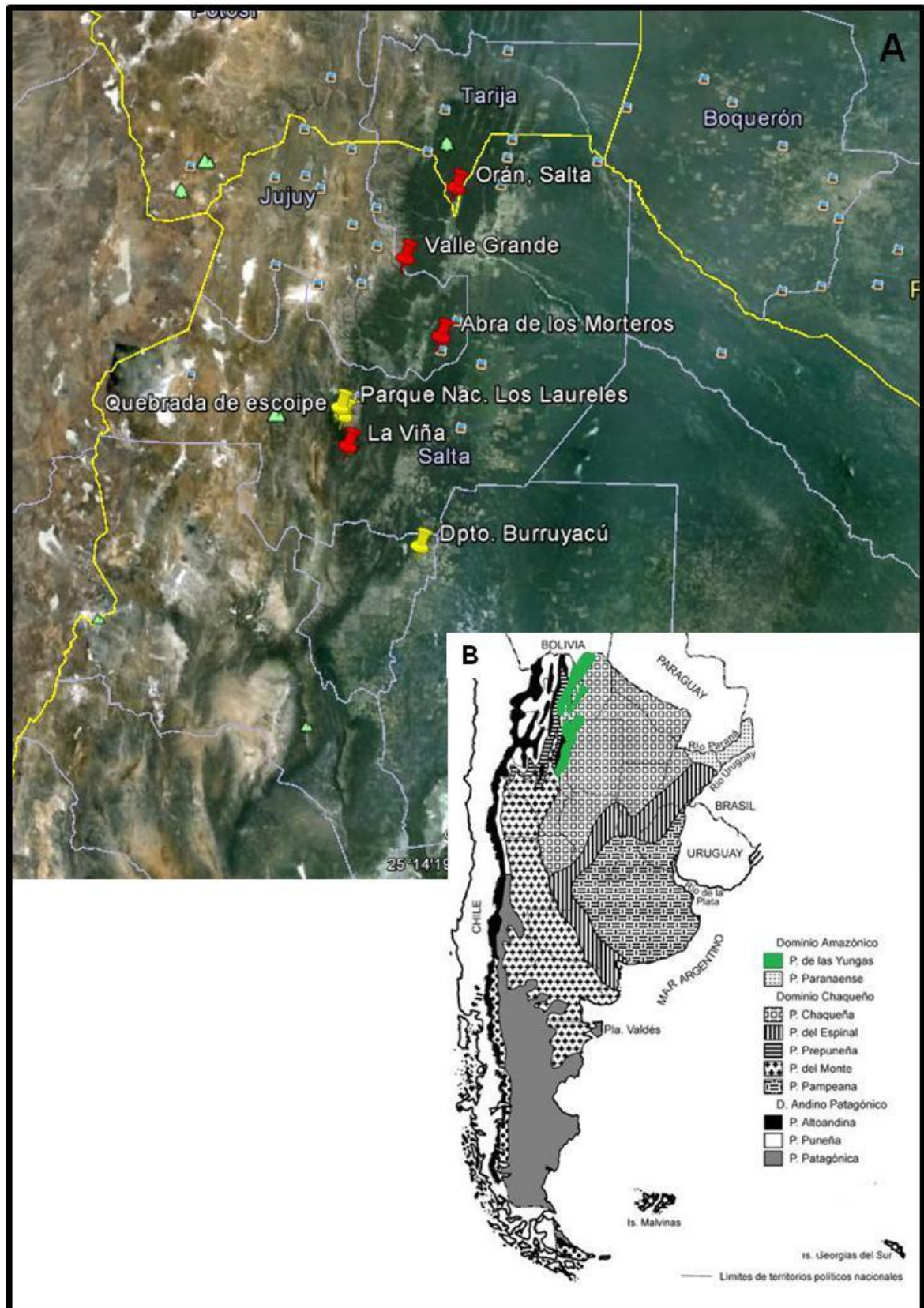
**NOMBRES VULGARES:** "Pichi-blanco", Sacha ruda" o "Chuquisaca".

### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.**

Crece en el piso inferior de la selva tropical Tucumano-Boliviana, en la Provincia Biogeográfica de la Yunga (Salta, Jujuy y Tucumán), entre los 1000 y 1600 m sobre el nivel del mar (Xifreda y Seo, 2006), frecuentemente en laderas húmedas y barrancas abruptas. (Fig. 37). El clima es cálido y húmedo, con lluvias principalmente estivales. La precipitación anual varía entre 900 a 2500 mm y la temperatura media anual entre 14° y 26°. Se producen heladas en todo el territorio y en zonas más elevadas nevadas (Cabrera, 1971).

### **USO VERNÁCULO:**

El leño se utiliza como tónico estomacal, y la corteza como antipruriginosa (Toursarkissian, 1980)



**Figura 37: A: Distribución geográfica de *Alvaradoa subovata* Cronquist.**  
 ▲ Sitios de Colección; ▲ Citas de herbarios y bibliográficas; **B:** Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *A. subovata* Cronquist.

---

### **CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

#### **HOJAS.**

Las hojas son compuestas, pecioladas, alternas, imparipinnadas con 16-24 folíolos, de 2-4 cm. de longitud x 0,4-1 cm. latitud, oblongos, alternos, de borde entero, ápice retuso y base aguda (Fig. 38 B, D; Fig. 40A, B).

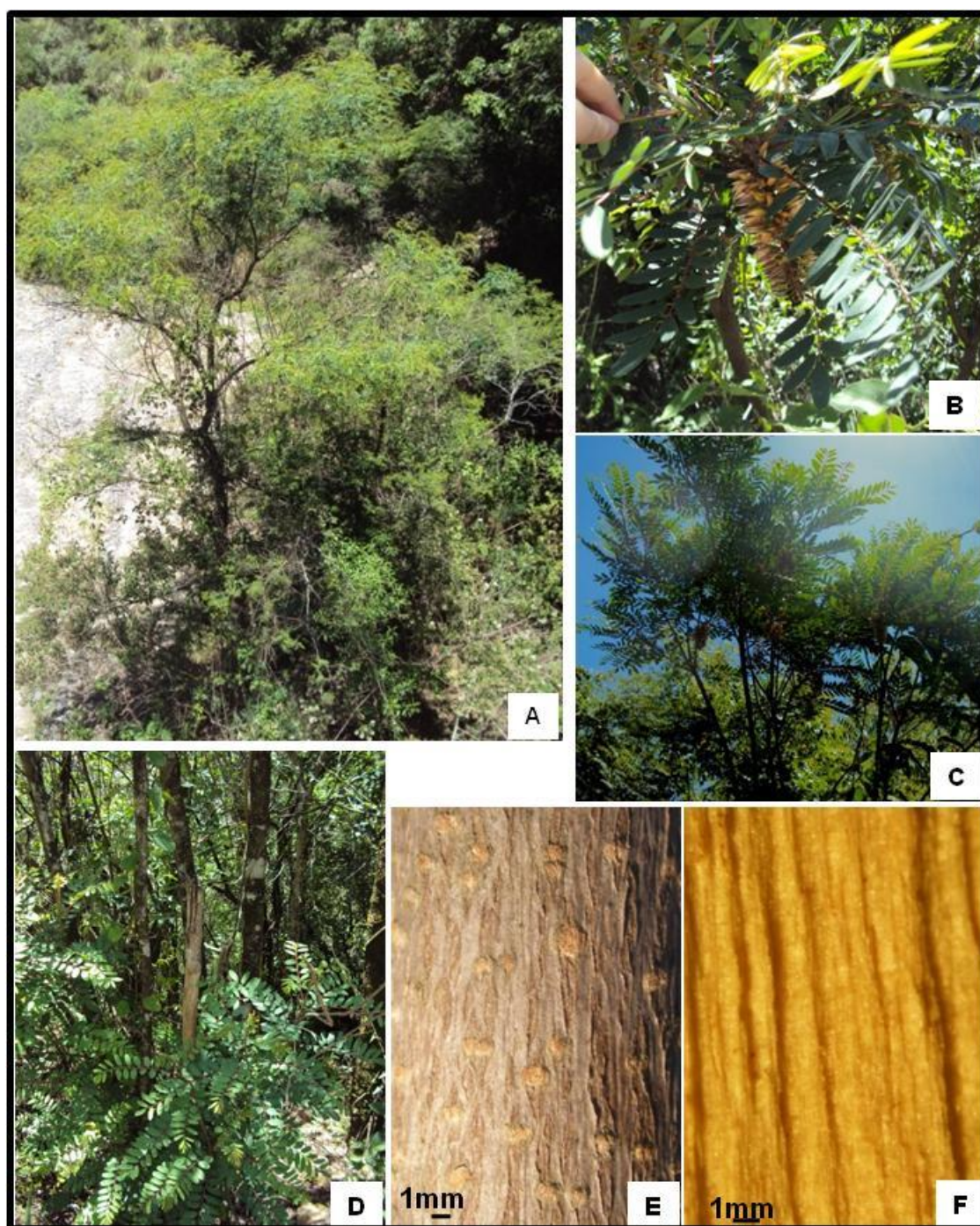
#### **CORTEZA.**

La superficie externa de la corteza del tallo es de color castaño grisáceo, con rugosidades y escasas grietas longitudinales. Posee escaso espesor de súber y en ramas jóvenes se destacan numerosas lenticelas. La superficie interna es lisa, de color castaño claro; presenta fractura entera, sabor amargo y olor característico (Fig. 38E).

#### **LEÑO.**

El leño es de color amarillo pálido, poco brillante, con una leve disminución en color en la zona de la albura. En sección transversal se observan anillos de crecimiento secundario muy poco diferenciados (Fig. 38F).





**Figura 38: Exomorfología de *Alvaradoa subovata* Cronquist.** A: Ejemplar adulto, B: Infructescencia, C: Ramas con infructescencias, D: Ejemplar joven en su habitat, E: Detalle de la corteza, F: Detalle del leño.



## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

### HOJA.

#### *Lámina del folíolo en vista superficial*

**Arquitectura Foliolar:** la venación es camptódroma, broquidódroma (Fig. 39A; Fig. 40B). Poseen de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinnadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres (Fig. 40 B, C). Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas y rectas o curvas. La red vascular es de densidad intermedia.

**Epidermis adaxial:** se observan papilas de forma esférica en gran parte de las células, las células son poligonales de paredes rectas y ligeramente más grandes que las de la epidermis abaxial, elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta tricomas simples, unicelulares, de paredes delgadas, que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras (Fig. 40D).

**Epidermis abaxial:** las células son poligonales de paredes rectas y elongadas sobre el nervio medio. Se observan estomas hundidos del tipo anomocítico y tricomas similares a los descritos para la epidermis adaxial (Fig. 39B, C, G; Fig. 40 E).

#### *Lámina del folíolo en corte transversal*

**Epidermis adaxial:** uniestratificada. Se observan papilas de gran tamaño cubiertas de una cutícula lisa al igual que las células epidérmicas. (Fig. 39E)

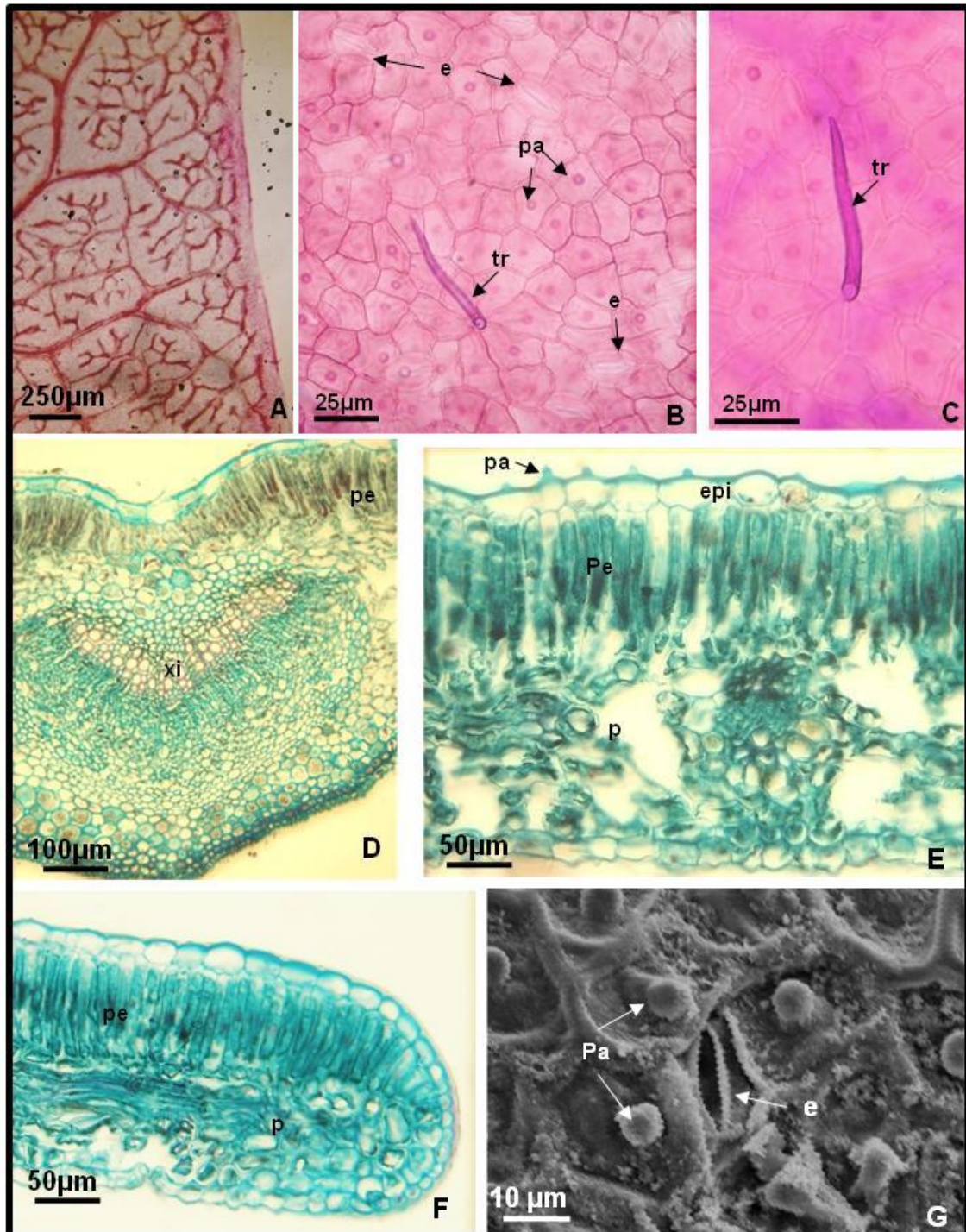
El folíolo es hipoestomático. El mesófilo es de estructura dorsiventral con 1 hilera de parénquima en empalizada (Fig.39D, F; Fig. 40F). Se observan drusas y escasos estiloides de oxalato de calcio en el parénquima esponjoso (Fig. 43B). En posición subepidérmica la vena media se halla reforzada por colénquima de tipo laminar del lado adaxial y abaxial. El nervio medio está constituido por 5 a 9 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en arco y acompañados por una vaina conspicua de fibras (Fig. 39D; Fig. 40F). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 40G).

**Epidermis abaxial:** uniestratificada y papilosa (Fig.39E).

### PECÍOLULO

En sección transversal es de contorno circular. La epidermis es uniestratificada, con cutícula delgada y tricomas unicelulares, similares a los descritos para las hojas. En posición subepidérmica se localiza colénquima laminar que se extiende hasta el nervio medio. El sistema vascular está constituido por 7 a 9 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco, cada haz presenta un casquete de fibras blandas. (Fig. 40H).

Los caracteres cuantitativos de las hojas se expresan en la Tabla 13.



**Figura 39: Fotomicrografía de hoja de *Alvaradoa subovata* Cronquist. A-C:** Vista superficial, **A:** Arquitectura foliolar; **B y C:** Epidermis abaxial; **D-E:** Lámina en corte transversal; **D:** Nervio medio; **E:** Mesófilo; **F:** Borde del semilímbo; **G:** MEB, epidermis abaxial. **e:** Estoma; **epi:** Epidermis adaxial; **p:** Parénquima; **pa:** Papila; **pe:** Parénquima en empalizada; **tr:** tricoma simple; **xi:** Xilema.





**Figura 40: Micrografía de hoja de *Alvaradoa subovata* Cronquist . A: Morfología foliar; B-C: Arquitectura foliolar; B: Aspecto general; C: Venación del borde y areolas; D-E: Epidermis en vista superficial; D: adaxial; E: abaxial; F-H: Sección transversal; F: Nervio medio; G: Detalle de lo indicado en F; H: Pecíolo.**

## CORTEZA

### *Corteza externa*

El ritidoma se halla constituido por una sola peridermis exfoliante que consta de 8-12 hileras de células de súber de dimensiones variables (Fig. 41A). Las células del súber, en sección transversal, son generalmente rectangulares, aplanadas de paredes homogéneas de engrosamiento mediano. En vista superficial son de forma poligonal. La felodermis es pluriestratificada con células de paredes delgadas. Se observa una amplia región de floema no funcional y parénquima (Fig. 41A y B).

### *Corteza interna*

En el límite con el floema funcional se observan numerosos grupos heterogéneos de fibras, macroesclereidas y braquiesclereidas de diferentes dimensiones (Fig. 41A, B, C-G). El parénquima floemático es abundante con grupos aislados de esclereidas y muy escasos cristales poliédricos y drusas de oxalato de calcio.

El floema funcional se encuentra atravesado por radios 1 a 3 seriados (Fig. 41B). El sistema radial está constituido por células parenquimáticas procumbentes de paredes sin engrosar, que dejan escasos espacios intercelulares y que contienen drusas y estiloides de oxalato de calcio. El parénquima axial posee células alargadas longitudinalmente de morfología variada, con abundante cantidad de estiloides de oxalato de calcio (Fig. 41H, I).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 13.

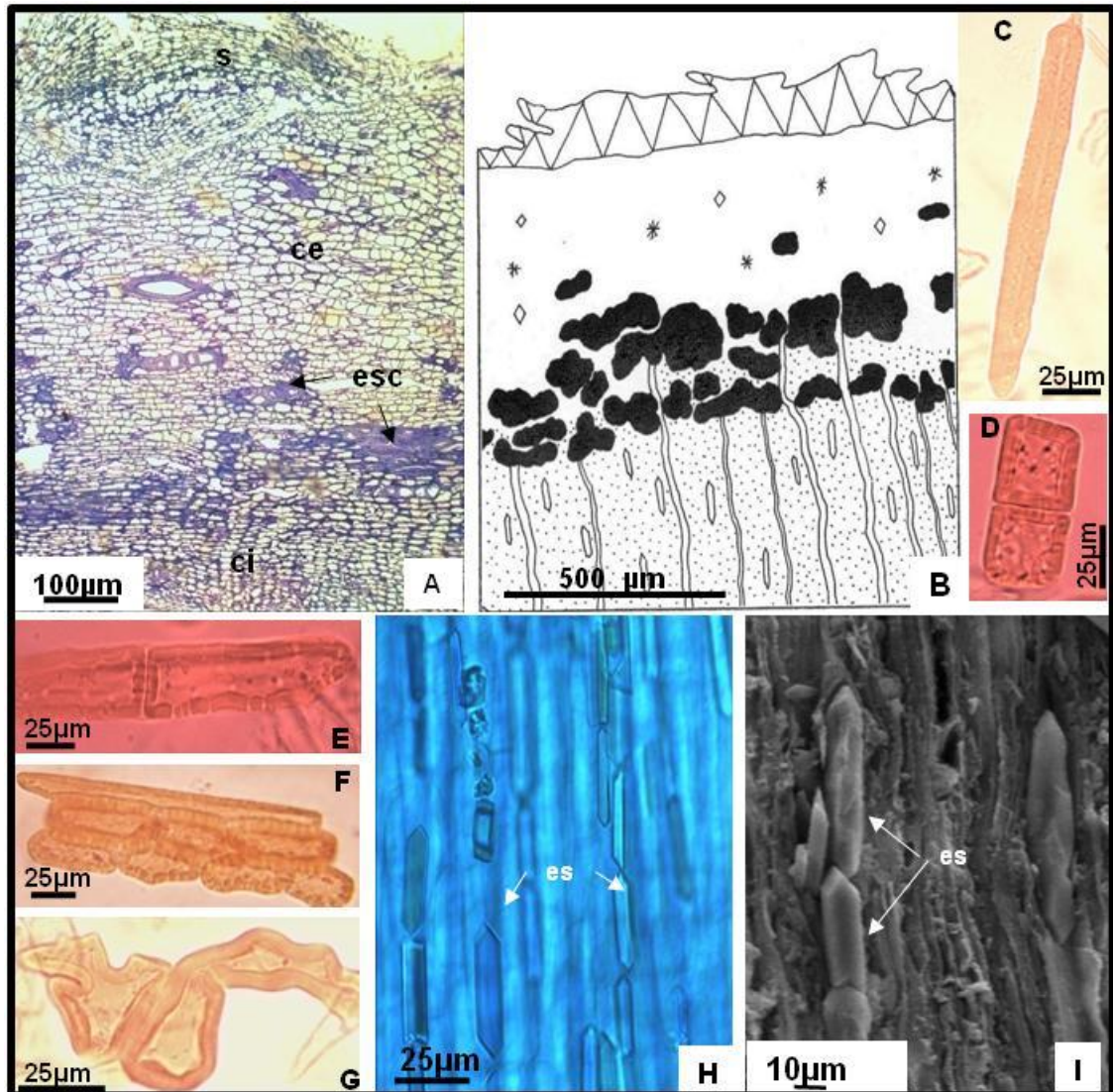
## LEÑO

La porosidad es difusa, no uniforme. El crecimiento es anular, los anillos están poco demarcados por una banda inconspicua de fibras de paredes poco engrosadas, comprimidas tangencialmente, de 2 a 3 células de espesor (Fig. 42A, D, J). Los vasos son de contorno circular, siendo escasos los elípticos, con placa de perforación simple y puntuaciones intervasculares alternas (Fig. 42E-I). Se disponen algunos solitarios y otros múltiples con distribución radial en el duramen y radial y oblicua en la albura (Fig. 42A, D, J). Las traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas son de paredes medianamente engrosadas. Hay fibras septadas y no septadas, con puntuaciones simples a rebordeadas y paredes medianamente engrosadas.

El parénquima axial es muy escaso y difuso, con al menos dos células por banda de parénquima. El sistema radial está constituido por radios 1 a 3 seriados, no estratificados y heterocelulares con 2 a 4 hileras de células erectas en los márgenes y procumbentes en el cuerpo radial. Las células son de paredes medianamente engrosadas, con puntuaciones simples y no dejan espacios intercelulares entre sí (Fig. 42B, C).

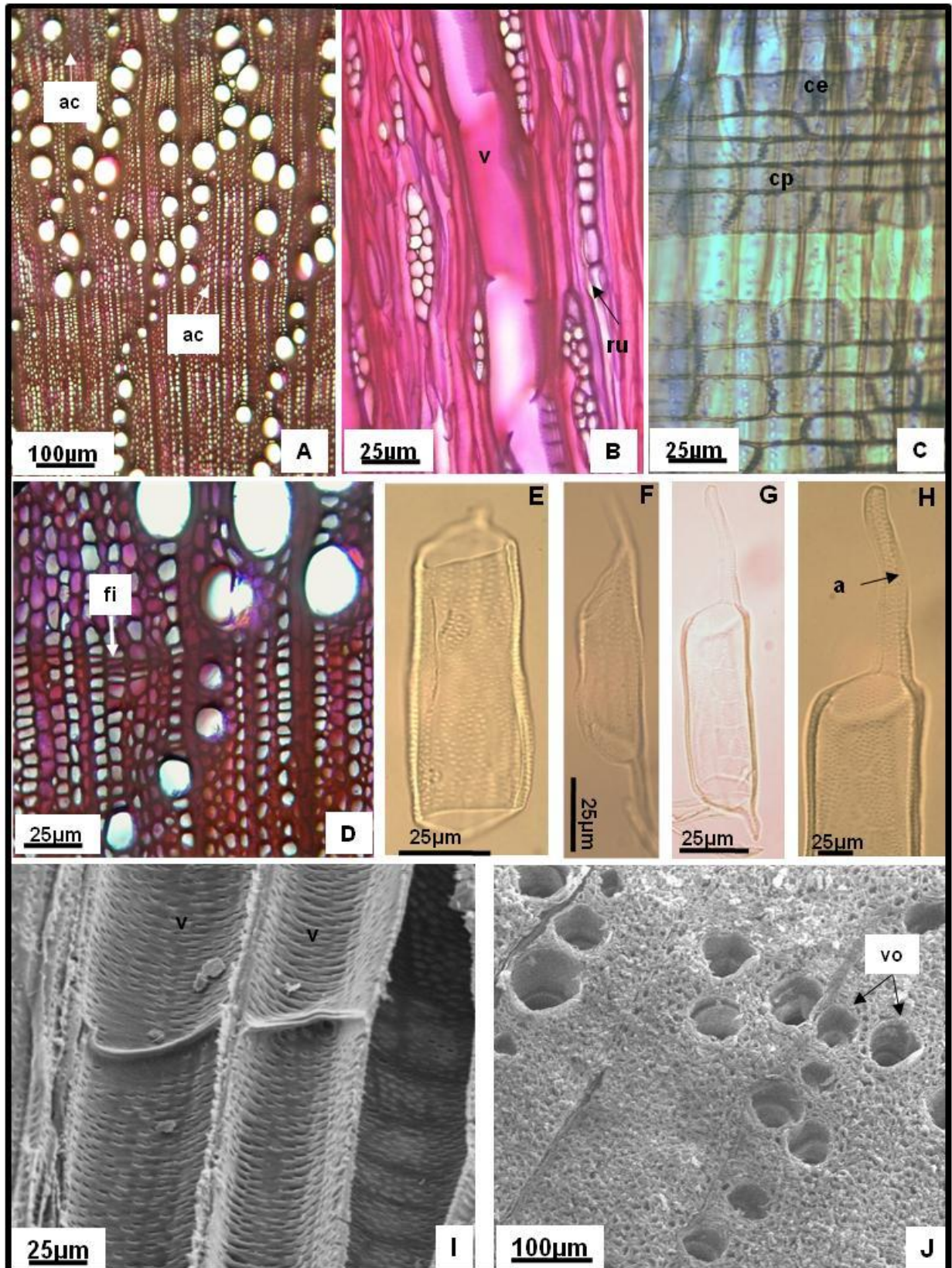
Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 13.





**Figura 41 : Fotomicrografía de la corteza de *Alvaradoa subovata* Cronquist.**  
**A-B:** Sección transversal; **B:** Representación esquemática; **C-G:** Material macerado; **C y E:** Macroesclereidas; **D:** Braquiesclereidas; **F:** Braqui y macroesclereidas **G:** Braquiesclereidas con proyecciones; **H:** Sección longitudinal; **I:** MEB, sección longitudinal. **ce:** Corteza externa; **ci:** Corteza interna; **es:** Estiloides; **esc:** Esclerénquima; **s:** Súber.





**Figura 42: Fotomicrografía del leño de *Alvaradoa subovata* Cronquist.** A: Sección transversal; B: Sección longitudinal tangencial; C: Sección longitudinal radial; D: Detalle de lo indicado en A; E-H: Material macerado, miembros del vaso; I-J: MEB; I: Sección longitudinal; J: Sección transversal. a: Apéndice; ac: Anillo de crecimiento delimitado por banda de fibras; ce: Células erectas; cp: Células procumbentes; es: Estiloides; fi: Banda inconspicua de fibras; ru: Radio uniseriado; v: Vaso; vo: Vasos de distribución oblicua.

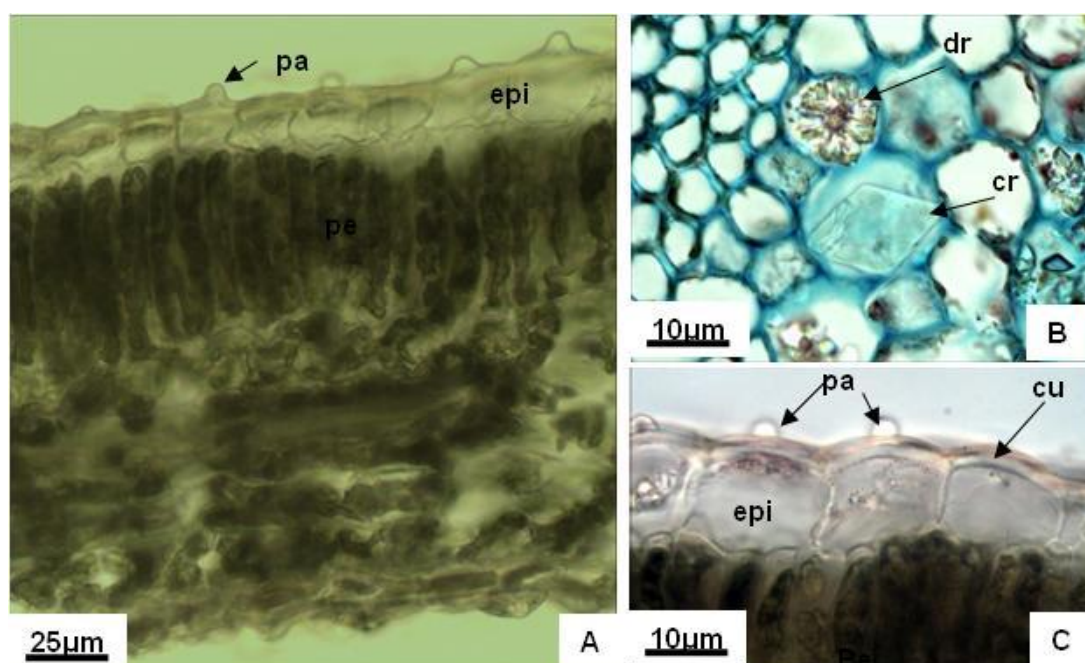
<i>Hoja</i>	Índice de estomas		9 ± 1
	Estomas x mm <sup>2</sup>		143,3 ± 27,1
	Índice de empalizada		6,6 ± 1,0
	Tricomas simples x mm <sup>2</sup>		111,4 ± 27,1
	Longitud de tricomas simples (µm)		153,6 ± 26,6 µm
<i>Corteza</i>	Latitud células de súber en transcorte		10,4±1,6
	Longitud células de súber en transcorte		22,8±3,1
	Diámetro células de. súber		25,8±4,2
	Diámetro braquiesclereidas		19,6±2,1 (16-24)
	Long. Macroesclereidas	Cortas (59%)	54,4 ± 11,2 (40-72)
		Largas (41%)	115,2 ± 15,2 (90-150)
	Long. Fibroesclereidas	Cortas (62%)	594,0 ± 99,8 (440-688)
		Largas (38%)	809,3 ± 83,2 (720-980)
	Long. Fibras no septadas	Cortas (55%)	978,7 ± 77,1 (800-1100)
		Largas (45%)	1329,2 ± 118,5 (1200-1500)
<i>Leño</i>	Longitud elementos del vaso		292,8 ± 75,7 (208-408)
	Diámetro elementos del vaso		65,6 ± 9,3 (52-80)
	Longitud fibras septadas		665,0 ± 80 (600-816)
	Longitud fibras no septadas		699,6 ± 87,4 (560-832)
	Latitud de fibras		22,4±3,4
	Vaso x mm <sup>2</sup>		30,2 ± 7,0
	Altura de los radios	Unicelulares	8±1
		Pluricelulares	23±3
	Índice de vulnerabilidad		2,2
	Índice de mesomorfía		644

**Tabla 13: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Alvaradoa subovata* Cronquist;** los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.



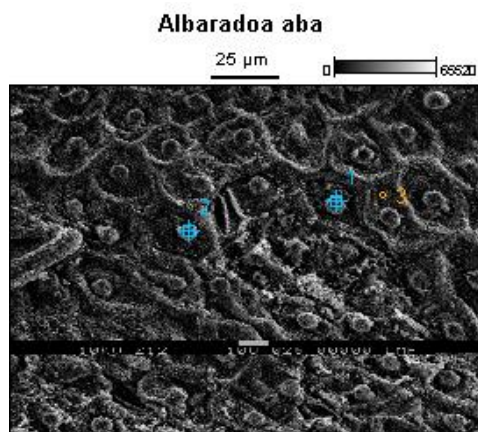
## ANÁLISIS HISTOQUÍMICO.

Mediante la tinción con el reactivo de Sudán IV pudo observarse la presencia de una capa de cutina sobre ambas epidermis, recubriendo las papilas (Fig. 43A, C). Mediante la técnica de análisis de rayos X con microsonda de electrones se estudiaron las papilas observadas en la epidermis de los folíolos (Fig. 44). La técnica permite detectar aquellos elementos cuyo número atómico esté comprendido entre 11 (sodio) y 92 (uranio) (Ipohorski y Marrapodi, 1985; Van Steveninck y Van Steveninck, 1991).

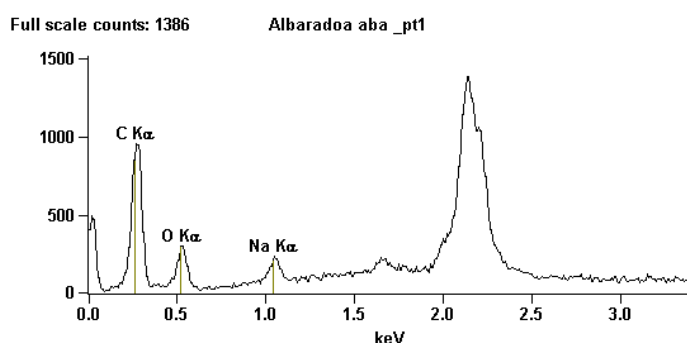


**Figura 43: Análisis histoquímico de *Alvaradoa subovata* Cronquist.**  
**A-C:** Sección transversal de hoja; **A:** Tinción con solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%; **B:** Observación de cristales de oxalato de calcio bajo luz polarizada; **C:** Tinción con Sudán IV; **epi:** Epidermis adaxial; **cr:** Cristal romboédrico, **cu:** Cutícula; **dr:** Drusa; **pa:** Papila; **pe:** Parénquima en empalizada conteniendo taninos.





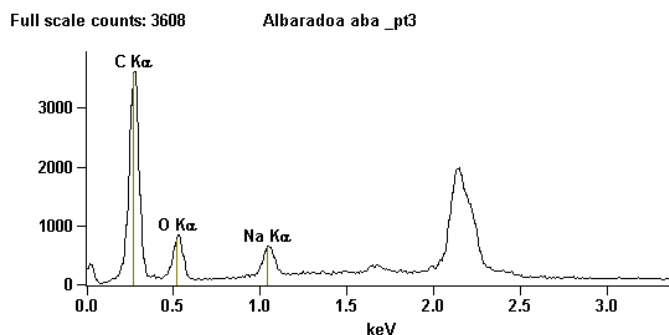
**Figura. 44:** Microscopia electrónica de barrido de la epidermis abaxial de *A. subovata*. 1, 2 y 3: zonas donde se realizó el análisis elemental por EDAX.



**Análisis elemental:**

Filter Fit	Chi-squared value:	1.915		
Correction Method:	Proza (Phi-Rho-Z)			
Acc.Voltage:	10.0 kV	Take Off Angle:	18.4 deg	
Element	Element	Norm.	Atom %	Compnd
Line	Wt.%	Wt.%		Formula
C K	72.58	72.58	80.40	C
O K	20.05	20.05	16.67	O
Na K	1.93	1.93	1.12	Na
Ca K	5.44	5.44	1.81	Ca

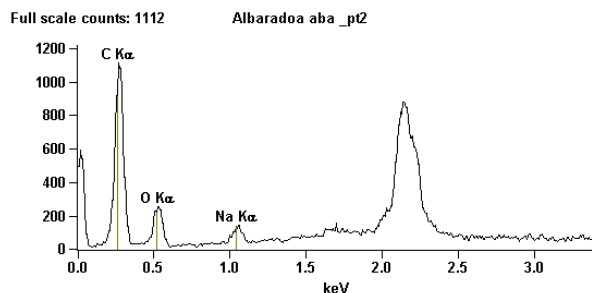
**Figura. 45:** Espectro EDAX realizado sobre el punto 1 (papila 1). **C:** Carbono; **O:** Oxígeno; **Na:** Sodio.



**Análisis elemental:**

Filter Fit	Chi-squared value:	2.380		
Correction Method:	Proza (Phi-Rho-Z)			
Acc.Voltage:	10.0 kV	Take Off Angle:	18.4 deg	
Element	Element	Norm.	Atom %	Compnd
Line	Wt.%	Wt.%		Formula
C K	76.20	76.20	82.22	C
O K	19.07	19.07	15.45	O
Na K	3.32	3.32	1.87	Na
Ca K	1.42	1.42	0.46	Ca
Total	100.00	100.00	100.00	

**Figura. 46:** Espectro EDAX realizado sobre el punto 2 (papila 2). **C:** carbono; **O:** oxígeno; **Na:** sodio.



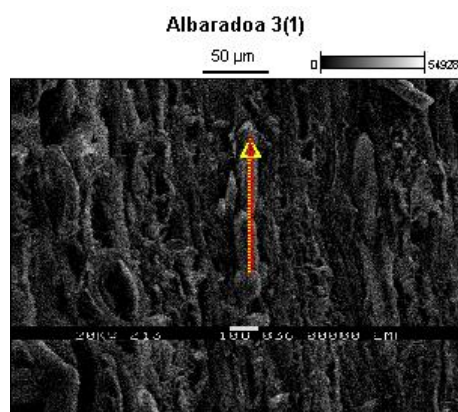
**Figura. 47:** Espectro EDAX realizado sobre el punto 3 (epidermis). **C:** carbono; **O:** oxígeno; **Na:** sodio.

El análisis por difracción de rayos X detectó cantidades significativas de elementos tales como carbono, oxígeno, sodio y calcio. Se observó un pico de intensidad entre los 2 y 2,5 KeV, pero no pudo correlacionarse con ningún elemento conocido. Tampoco hubo diferencia en la composición elemental de la papila (Fig. 45, 46) con la obtenida para un punto arbitrario en la epidermis (Fig.47)

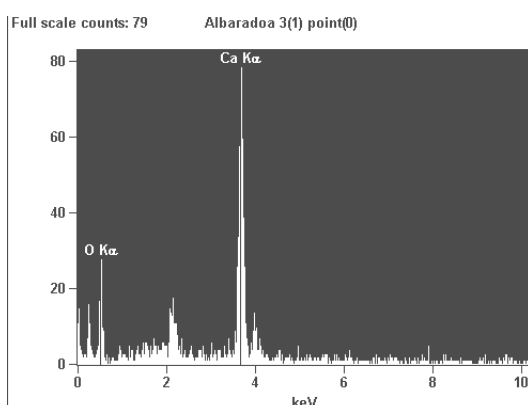
La tinción de los cortes transversales de folíolos con una solución acuosa de cloruro férrico al 10% permitió detectar taninos en las células del parénquima en empalizada y en menor medida en el parénquima esponjoso (Fig. 43A, C).

La observación bajo luz polarizada de los folíolos permitió detectar gran cantidad de drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio de gran tamaño en el parénquima (Fig. 43B). La observación de los cortes longitudinales de corteza y leño bajo luz polarizada permitió observar cristales poliédricos y estiloides.

Los estiloides de la corteza también fueron analizados mediante la técnica de análisis de rayos X con microsonda de electrones para conocer su naturaleza elemental (Fig. 48, 49):



**Figura 48:** Microscopia electrónica de barrido de la corteza de *A. subovata*. Estilóide. Zona donde se realizó el análisis elemental por EDAX. Accelerating Voltage: 20.0 kV. Magnification: 500



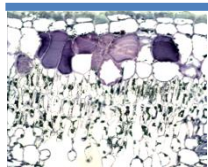
#### Análisis elemental:

Filter Fit Chi-squared value: 1.688  
Correction Method: Cliff-Lorimer (MBTS) w/ Absorbance  
Acc.Voltage: 20.0 kV Take Off Angle: 18.1 deg

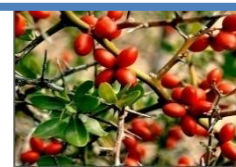
Element Line	Element Wt. %	Norm. Wt. %	Atom %	Compnd Formula
C K	38.61	38.61	65.71	C
O K	3.88	3.88	4.96	O
Ca K	57.51	57.51	29.34	Ca
Total	100.00	100.00	100.00	

**Figura. 49:** Espectro EDAX realizado sobre el estilóide. **C:** carbono; **O:** oxígeno; **Ca:** calcio.

Se detectaron cantidades significativas de calcio, y en menor medida, carbono y oxígeno (Fig. 49). La forma más frecuente que tienen las plantas de neutralizar el calcio es bajo la forma de una sal de oxalato:  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .



## *Castela coccinea* Griseb.



***Castela coccinea*** Griseb., *Abh. Konigl. Ges. Wiss. Gottingen* 19:107. 1874.

*Ximenia Americana* var. *purbens* Griseb. *Symb. Fl. Argent.* 149.1879;

Arbusto dioico de 1-3 m de altura de corteza cinéreo-blancuzca y agrietada irregularmente, con espinas muy gruesas y rígidas, de 2-8 x 2-4 mm (Fig. 49A). Hojas 1,5-3 x 0,5-1 cm, con pecíolo de 2-3 mm de longitud, fasciculadas o sub-solitarias, en las axilas de las espinas; coriáceas, enteras, lobuladas o dentadas en la mitad apical (Fig. 49B, C; Fig.52A, B). Flores estaminadas rojizas a amarillentas, agrupadas en racimos axilares de 1-1,5 cm, con brácteas pequeñas triangulares rojas y pubérulas (Fig. 49B). Sépalos triangulares, sub-carnosos, pubérulos por fuera de 1mm de longitud. Pétalos rojizos-amarillentos, ovales, obtusos, elípticos, membranáceos, 3,5 - 4,5 x 2 mm. Estambres más pequeños que los pétalos, con filamentos subulados, dilatados hacia la base y pilosos, con anteras extrorsas, de 2-2,5 mm de longitud. Disco glabro. Pistilodio rudimentario, glabro. Flores pistiladas sobre un disco lobulado, gineceo 4-5 carpelar, con los estilos unidos. Fruto drupa de color rojizo a violáceo, ovoide de 6-6,5 x 0,6 cm (Fig. 49 C) (Bernardello y col., 1990)

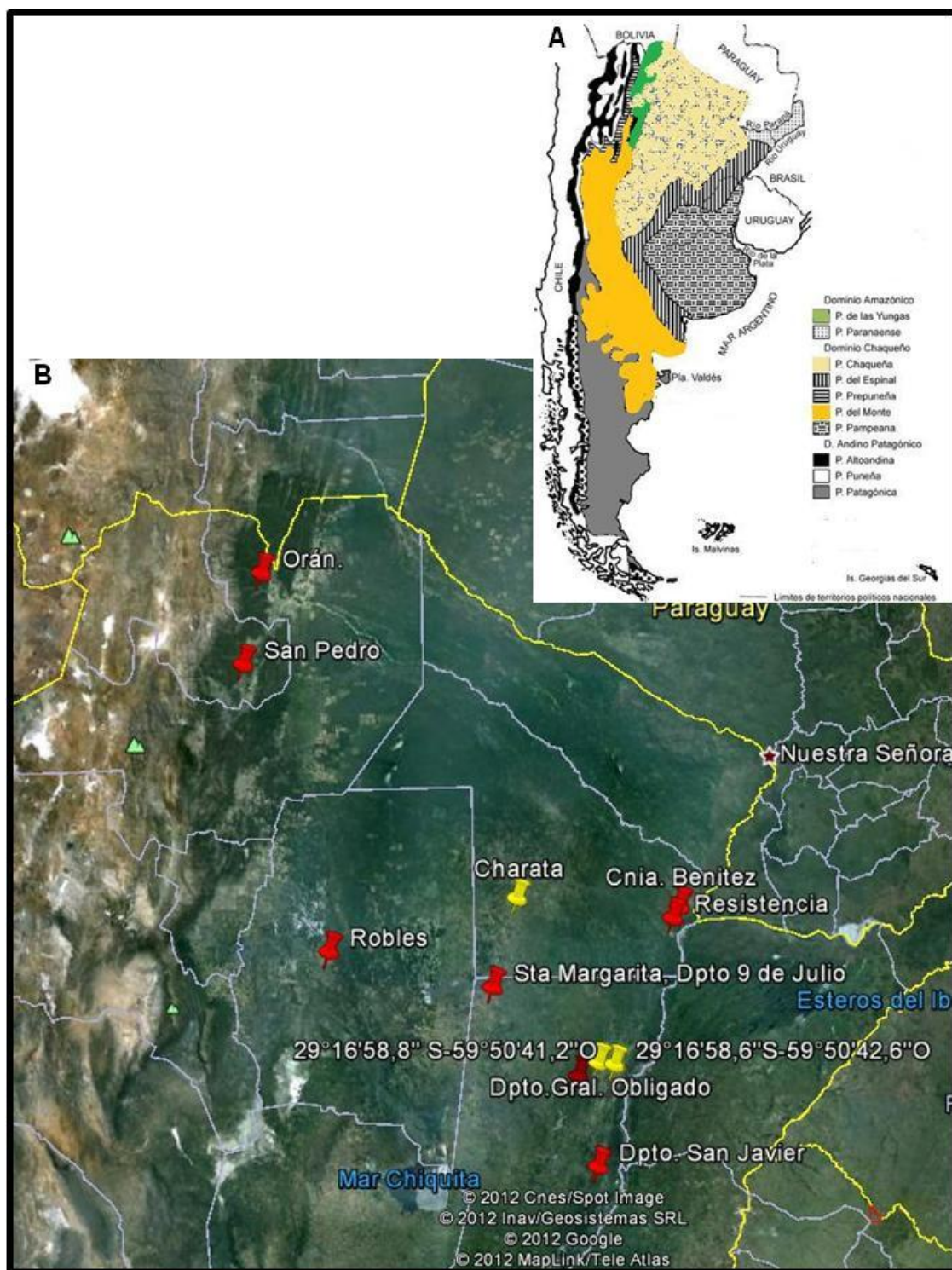
**NOMBRE VULGAR:** “Espada”, “Granadillo”, “Meloncillo”, “Mistol del zorro”, “Mistol del chivo”, “Molle colorado”, “Sacha melón” y “Sacha meloncillo”

### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.**

Habita en la Provincia Biogeográficas de las Yungas (Jujuy, Salta, Catamarca y Tucumán) en la Provincia Biogeográfica Chaqueña de llanura (Formosa, Chaco, este de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca y La Rioja, todo Santiago del Estero, norte de San Luis, Córdoba y Santa Fe, y noroeste de Corrientes) y en la Provincia Biogeográfica del monte (Salta, centro de Catamarca y La Rioja, por el centro y este de San Juan y Mendoza, centro y este de Neuquén, oeste de La Pampa, centro y este de Río Negro, hasta el nordeste de Chubut), entre los 0 a 1000 m sobre el nivel del mar (Fig. 50). Se extiende al sur de Bolivia y noroeste de Paraguay (Xifreda y Seo, 2006). El clima es típicamente continental, variando de cálido y húmedo con precipitaciones anuales desde los 500 a 2500mm en las yungas, pasando por cálido con precipitaciones estivales que oscilan entre los 500 y 1200 mm anuales en la provincia chaqueña, a cálido y seco con precipitaciones entre 80 y 250mm anuales en la provincia del monte (Cabrera, 1971).

### **USO VERNÁCULO.**

La corteza, hojas y raíz se utilizan en contra de la disentería, diarreas y fiebres intermitentes; también se reconoce como tónico gástrico (Xifreda y Seo, 2006). El cocimiento de la corteza es utilizado para tratar afecciones de las vías urinarias (Carrizo y col., 2005).



**Figura 50: Distribución geográfica de *Castela coccinea* Griseb. A: Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *Castela coccinea* Griseb. ; B: ▲ Sitios de colección; ▲ Citas de herbarios y bibliográficas.**



---

## **CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS**

---

### **HOJAS**

Simple, cortamente pecioladas, alternas, de 1,5-3 cm. de long. X 0,5-1 cm. lat., oblongas, pinnatinerviadas, de margen liso, ápice redondeado y base cuneada (Fig. 51B; Fig. 54A, B).

### **CORTEZA**

La superficie externa de la corteza del tallo y ramas laterales desarrolladas, es de color pardo grisáceo a pardo amarillento, muy rugosa y con ligeras estrías longitudinales y transversales cortas; posee lenticelas prominentes (Fig. 51D). La superficie interna, es de color pardo amarillento, suavemente estriada en forma longitudinal. Presenta fractura fibrosa.

### **LEÑO**

El leño es de color castaño amarillento, brillante (Fig.51E). No existe diferenciación entre duramen y albura. En sección transversal se observan anillos de crecimiento, delimitados por una franja pardusca. La porosidad es difusa, con tendencia a semicircular.



**Figura 51 : Exomorfología de *Castela coccinea* Griseb.** A: Aspecto general de un individuo adulto; B: Rama con flores; C: Rama con frutos; D: Detalle de la corteza; E: Leño.

## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

### HOJAS

#### *Lámina en vista superficial*

*Arquitectura foliar:* la venación es camptódroma, broquidódroma (Fig. 52A; Fig. 54C). Poseen de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinnadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres. Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas y rectas o curvas. La red vascular es de densidad intermedia reforzada.

*Epidermis adaxial:* Cutícula gruesa y lisa. Células poligonales de paredes anticlinales gruesas y rectas, ligeramente más grandes que las de la epidermis abaxial, elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta tricomas simples, unicelulares, de paredes delgadas con amplio lumen celular, de distintos tamaños que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras (Fig. 52B, D; Fig. 54E).

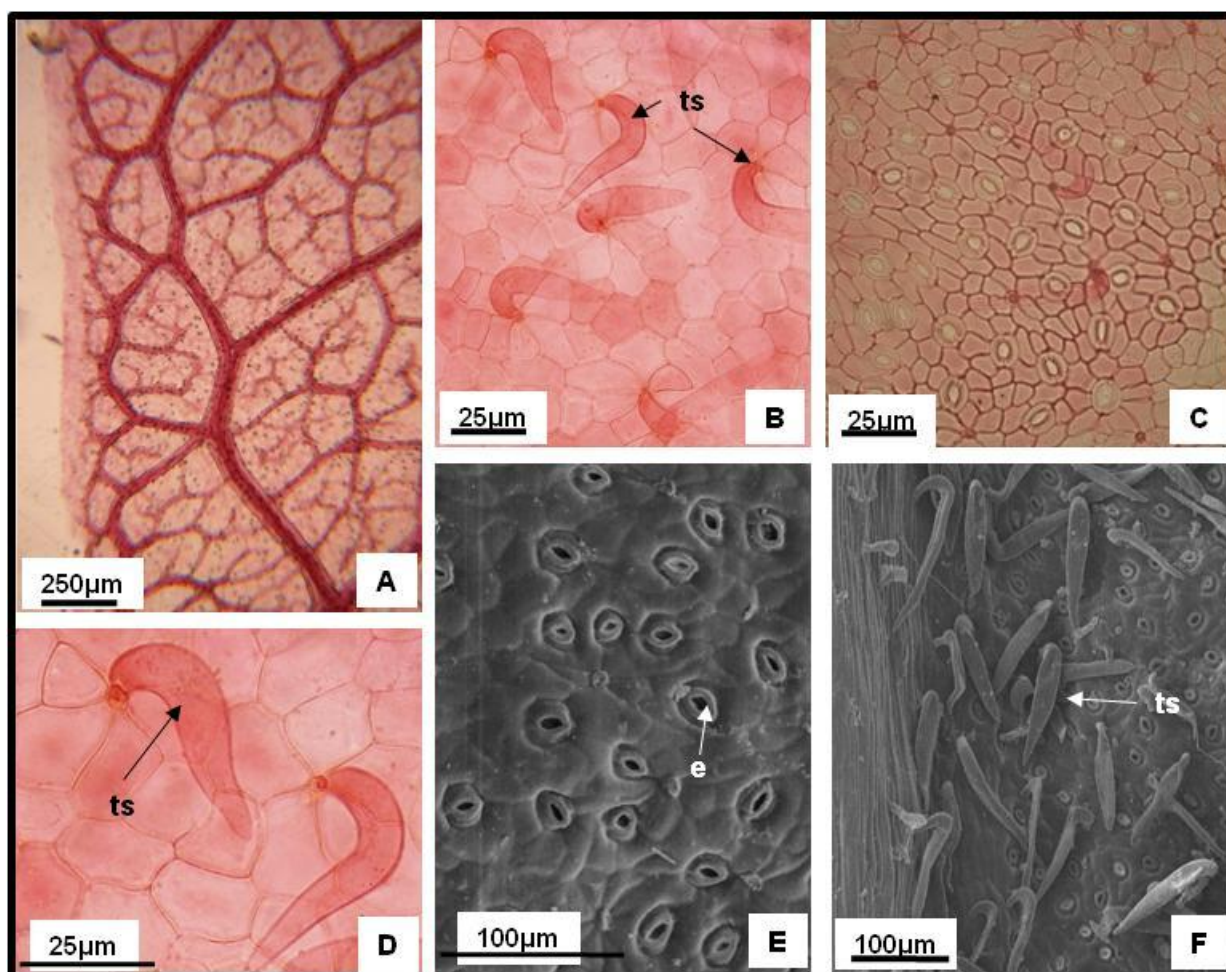
*Epidermis abaxial:* Cutícula lisa. Células poligonales de paredes anticlinales rectas y elongadas sobre el nervio medio. Se observan estomas del tipo anomocítico con reborde cuticular y al mismo nivel que las restantes células epidérmicas. Se observan tricomas simples similares a los descritos para la epidermis adaxial (Fig. 52C, E, F; Fig. 54D).

#### *Lámina en corte transversal.*

*Epidermis adaxial:* uniestratificada, con cutícula gruesa; por debajo se observa una hipodermis muy desarrollada y pluriestratificada por sectores. Sus células contienen mucílagos y, en la capa más cercana al parénquima en empalizada, se observan idioblastos con drusas de oxalato de calcio de gran tamaño. (Fig. 53B y F; Fig. 54F y G).

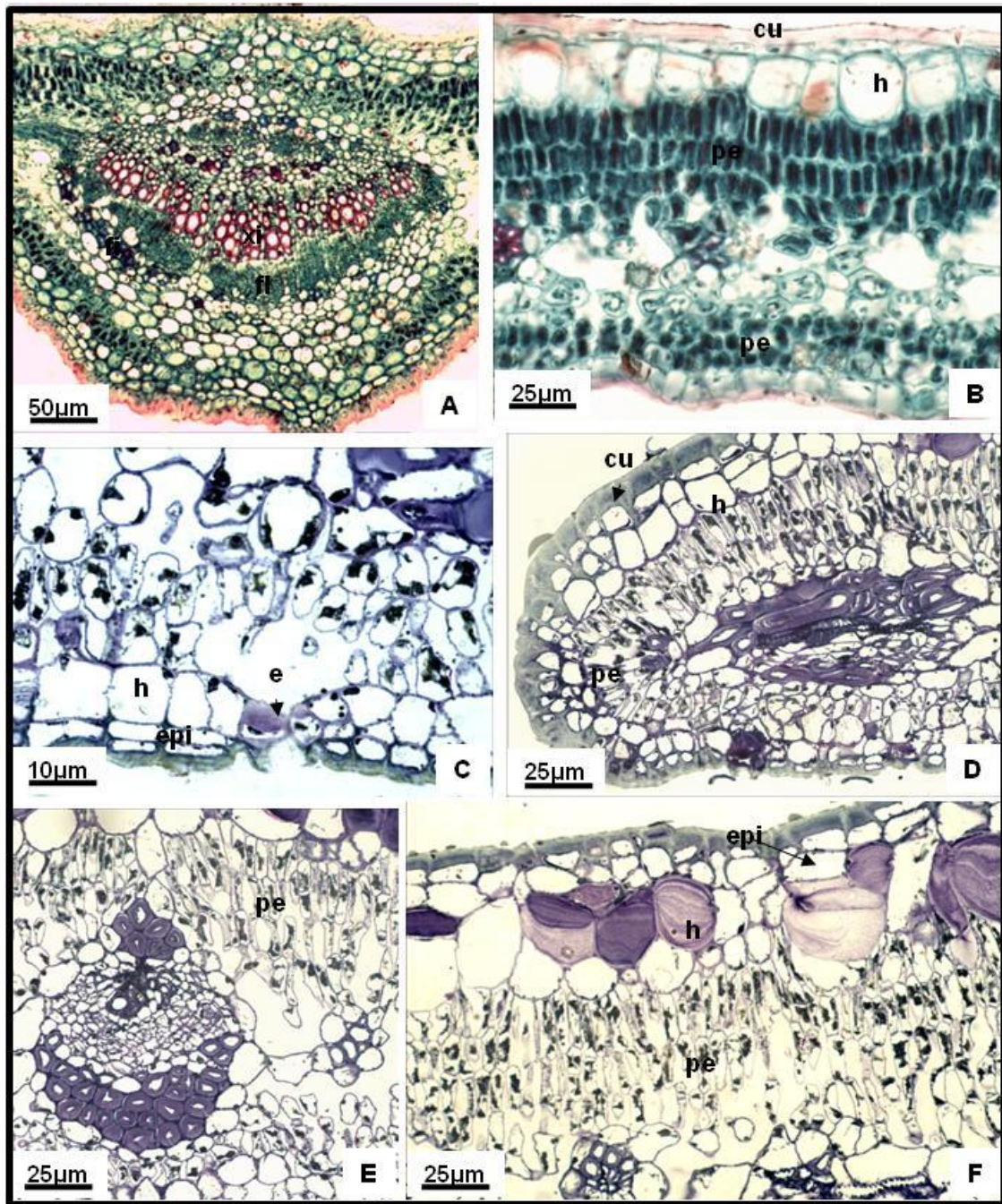
La hoja es hipoestomática. El mesófilo es de estructura isolateral, con 2-3 hileras de parénquima en empalizada, más cortas las del lado abaxial (Fig. 53B, D; Fig. 54F, G). Se observan abundantes drusas de gran tamaño y cristales solitarios de oxalato de calcio (Fig. 57C). La vena media se halla reforzada por colénquima de tipo laminar del lado adaxial y abaxial de la hoja. El nervio medio está constituido por 5 a 9 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco y acompañados por una vaina conspicua de fibras (Fig. 53A; Fig. 54F). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 53F).

*Epidermis abaxial:* uniestratificada, se observa la presencia de una hipodermis de células de menor tamaño que las observadas en la cara adaxial (Fig. 53C).



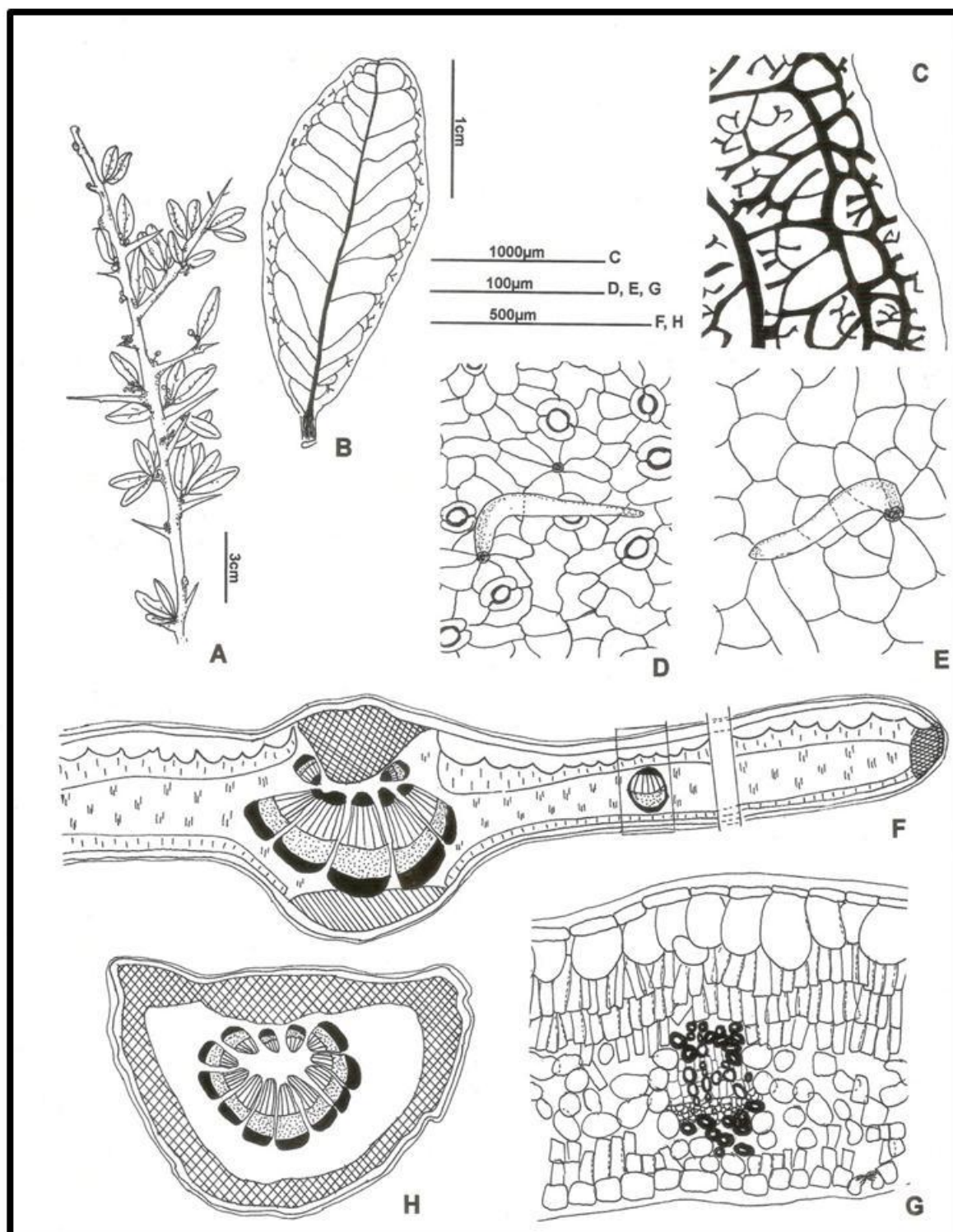
**Figura 52: Fotomicrografía de hoja de *Castela coccinea* Griseb. Vista superficial. A-D:** Microscopía óptica; **A:** Arquitectura foliar; **B:** Epidermis adaxial; **C:** Epidermis abaxial; **D:** Detalle de tricomas en epidermis adaxial; **E y F:** MEB, epidermis abaxial. **e:** estoma; **ts:** Tricoma simple.





**Figura 53: Fotomicrografía de hoja de *Castela coccinea* Griseb. A-F: Sección transversal; A: Nervio medio; B: Semilimbo; C: Semilimbo, epidermis abaxial; D: Borde del semilimbo; E: Nervio menor; F: Semilimbo, epidermis adaxial e hipodermis. cu: Cutícula; e: Estoma; epi: Epidermis; h: Hipodermis; pe: Parénquima en empalizada; x: Xilema.**





**Figura 54: Micrografía de hoja de *Castela coccinea* Griseb. A:** Rama con hojas y espinas; **B-C:** Morfología y arquitectura foliar; **B:** Aspecto general; **C:** Venación del borde y areolas; **D-E:** Epidermis en vista superficial; **D:** abaxial; **E:** adaxial; **F-H:** Sección transversal; **F:** Nervio medio; **G:** Detalle de lo indicado en F; **H:** Peciolo.

### PECÍOLO.

En sección transversal es de contorno plano convexo. La epidermis es uniestratificada, con cutícula gruesa, y tricomas unicelulares, similares a los descritos para las hojas. En posición subepidérmica se localizan 2-3 hileras de colénquima laminar. El parénquima fundamental contiene numerosos idioblastos con drusas de oxalato de calcio. El nervio medio está constituido por numerosos haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en círculo y reforzados por conspicuas fibras (Fig. 54H).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de la hoja se expresan en la Tabla 14.

### CORTEZA

#### *Corteza externa*

El ritidoma se halla constituido por 5 a 7 peridermis, de disposición escamosa o imbricada, formadas por 12 a 15 hileras de células de súber que alternan con floema no funcional (Fig. 55A, B). Las células del súber, en sección transversal, son cuadrangulares con paredes de engrosamiento homogéneo; en vista superficial son de forma poligonal. La felodermis es pluriestratificada con células de paredes delgadas.

#### *Corteza interna*

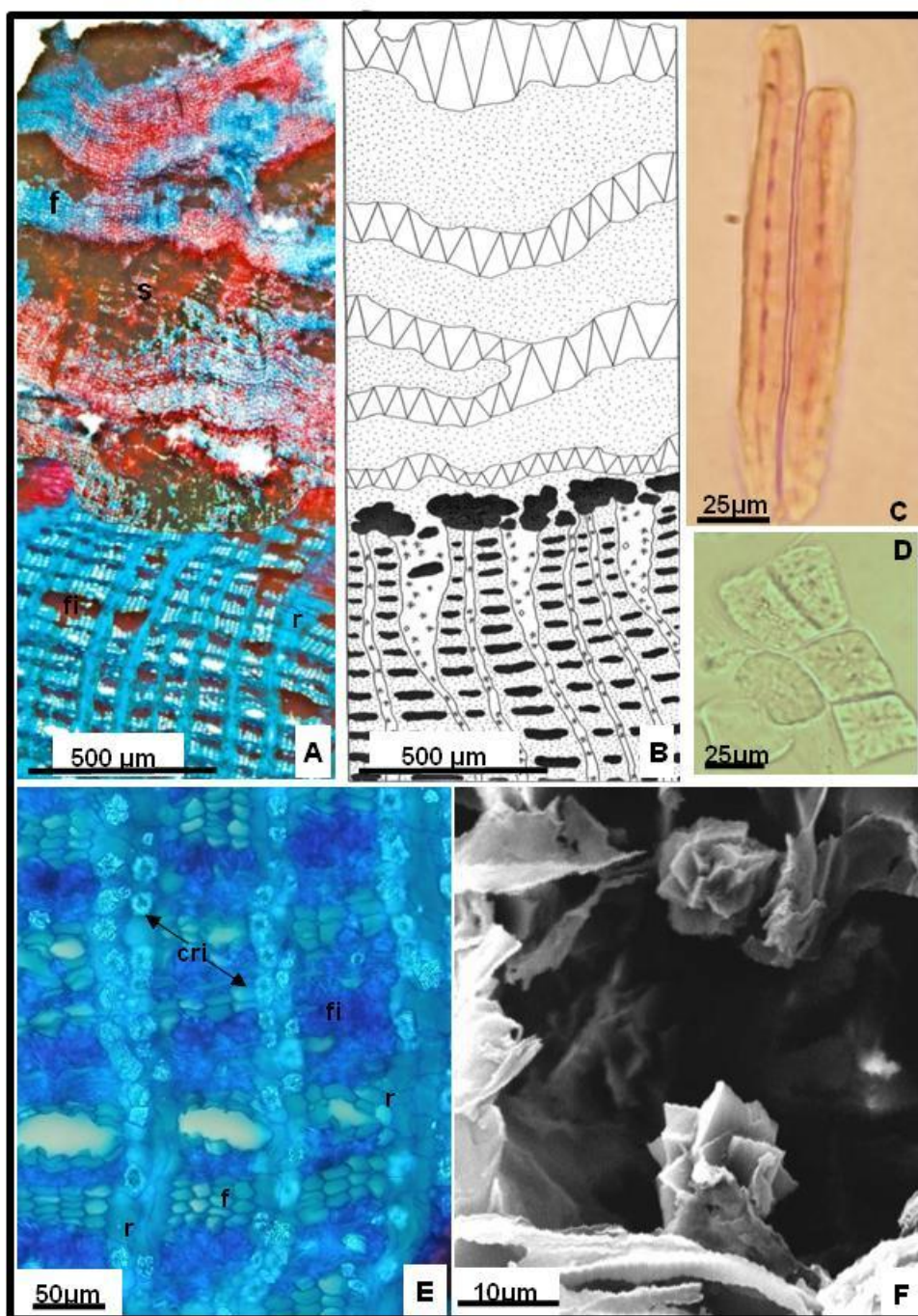
En el límite con el floema se observa un anillo discontinuo de macro y braquiesclereidas, algunas de las cuales llevan incluidos cristales romboédricos de oxalato de calcio (Fig. 55A, B).

Las fibras floemáticas se disponen aisladas o agrupadas en bandas tangenciales estratificadas y poseen un notable engrosamiento de su pared celular (Fig. 55A). Numerosas braquiesclereidas, macroesclereidas y fibroesclereidas pueden observarse aisladas, agrupadas entre sí o asociadas a las fibras (Fig. 55C, D).

El floema funcionales atravesado por radios 1 a 5 seriados que se ensanchan en la región distal (Fig. 55B y E).

El parénquima axial está constituido por células alargadas longitudinalmente, de diferentes tamaños. El parénquima radial se halla constituido por células parenquimáticas procumbentes de paredes sin engrosar que dejan escasos espacios intercelulares entre sí y poseen cristales poliédricos y drusas de oxalato de calcio (Fig. 55E, F).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 14.



**Figura 55 : Fotomicrografía de la corteza de *Castela coccinea* Griseb.** **A-B:** Sección transversal; **A:** Vista panorámica; **B:** Representación esquemática; **C-D:** Material macerado, **C:** Macroesclereidas; **D:** Braquiesclereidas; **E:** Corteza interna; **F:** MEB, drusas; **cri:** Cristales de oxalato de calcio; **f:** Floema; **fi:** Fibras; **r:** Radio; **s:** Súber.



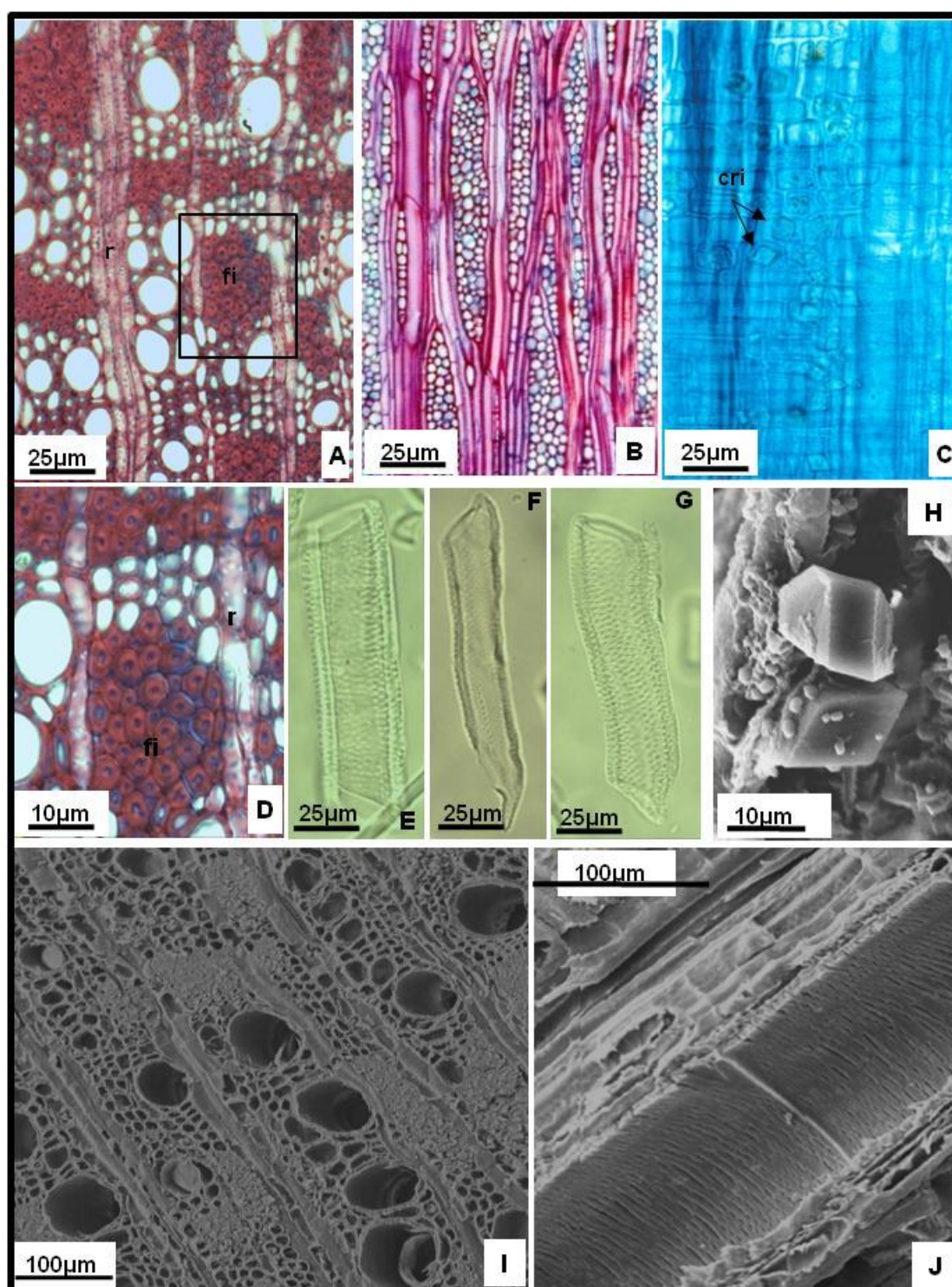
## LEÑO

La porosidad es difusa a semicircular, no uniforme. El crecimiento es semi-anular a anular; los anillos están delimitados por fibras y fibrotraqueidas reunidas en grupos interradales (Fig. 56 A, D, I). Los vasos son de contorno circular con placa de perforación simple horizontal a oblicua. Las puntuaciones intervasculares son areoladas con disposición alterna, con areola circular y abertura de la puntuación inclusa (Fig. 56E-G, J). Se disponen de manera radial, múltiples cortos de 3 a 5 elementos, racemiformes, geminados y algunos solitarios; en los anillos más anchos suelen distribuirse de manera oblicua (Fig. 56A, I).

Posee traqueidas, fibras xilares y fibrotraqueidas reunidas en grupos interradales al final del anillo de crecimiento, en el leño tardío, con un fuerte engrosamiento de sus paredes laterales (Fig. 56D). Las traqueidas son vasicéntricas. Las fibras libriformes son fusiformes, de disposición no estratificada, con puntuaciones simples y paredes fuertemente engrosadas.

El parénquima axial es paratraqueal vasicéntrico generalmente aliforme formado por 3 a 4 células por banda de parénquima. El sistema radial está compuesto por radios uni a pluriseriados (5-7 seriados), homogéneos, formados por células procumbentes con abundantes cristales poliédricos y drusas de oxalato de calcio (Fig. 56B, C, H).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 14.

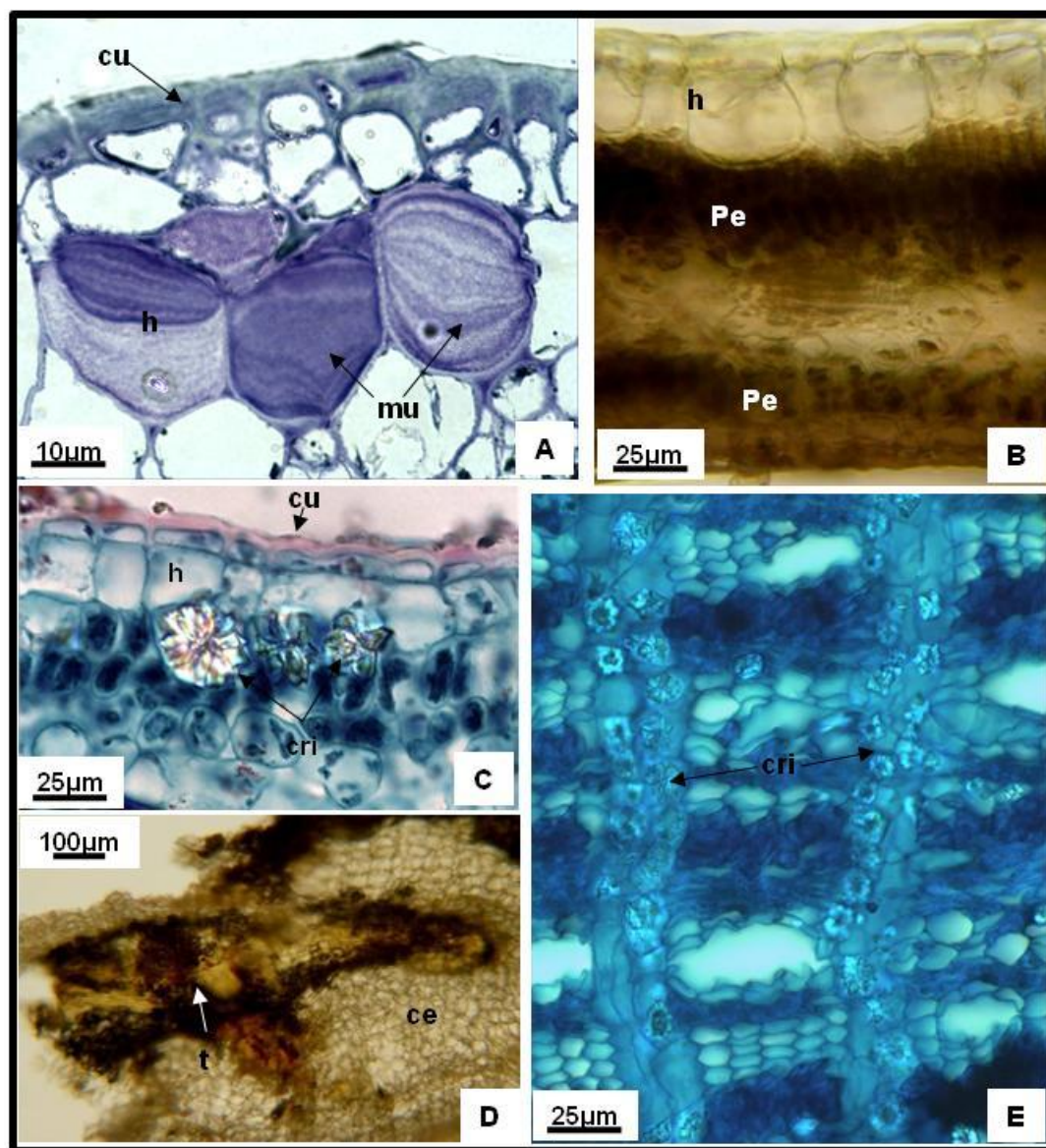


**Figura 56: Fotomicrografía del leño de *Castela coccinea* Griseb.** **A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal tangencial; **C:** Sección longitudinal radial; **D:** Sección transversal, detalle de lo indicado en **A**; **E-G:** Material macerado, miembros del vaso; **H-J:** MEB; **H:** Sección longitudinal, cristales poliédricos; **I:** Sección transversal; **J:** Sección longitudinal radial; **cri:** Cristales; **fi:** Fibras; **r:** Radio.

Hoja	Índice de estomas		14,0 ± 1,7
	Estomas x mm <sup>2</sup>		461,7 ± 50,3
	Índice de empalizada		11,4 ± 2,0
	Tricomassimples x mm <sup>2</sup>		95,5 ± 26,0
	Longitud de tricomas simples (µm)		90,60±3,27 a 137,60±20,80
Corteza	Latitud células de súber en transcorte		25,0±1,5
	Longitud células de súber en transcorte		25,0±1,5
	Diámetro células de. Súber		40,0±2,2
	Diámetro braquiesclereidas		30,0±2,6 (24-39)
	Long. Macroesclereidas	Cortas (67%)	39,0 ± 8,1 (24-50)
		Largas (33%)	90,2 ± 7,5 (80-100)
	Long. Fibroesclereidas		525,8 ± 69,2 (440-640)
	Long. Fibras no septadas	Cortas (75%)	774,8 ± 98,6 (528-960)
		Largas (25%)	1174,5 ± 172,6 (1000-1480)
Leño	Longitud elementos del vaso		186,4 ± 28,9 (150-296)
	Diámetro elementos del vaso		53,5 ± 18,8 (32-80)
	Longitud fibras no septadas		719,88 ± 117,4 (562-980)
	Latitud de fibras		11,6±1,78
	Vaso x mm <sup>2</sup>		209,7 ± 30,9
	Altura de los radios	Unicelulares	16±5
		Pluricelulares	25±7
	Índice de vulnerabilidad		0,25
	Índice de mesomorfía		47,5

**Tabla 14: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Castela coccínea* Griseb.;** los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.





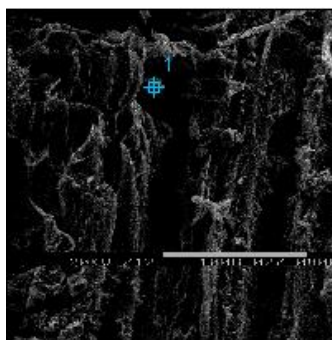
**Figura 57: Análisis histoquímico de *Castela coccinea* Griseb. A-C: Hoja en sección transversal; A: Hipodermis, tinción con violeta de cresilo; B: Semilimbo, tinción con solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%; C: Semilimbo, observación con luz polarizada; D-E: Corteza en sección transversal; D: Tinción con solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%; E: Corteza interna, observación con luz polarizada. ce: Corteza externa; cri: Cristales de oxalato de calcio; cu: Cutícula; h: Hipodermis; mu: Mucilagos; pe: Parénquima en empalizada; t: Taninos**



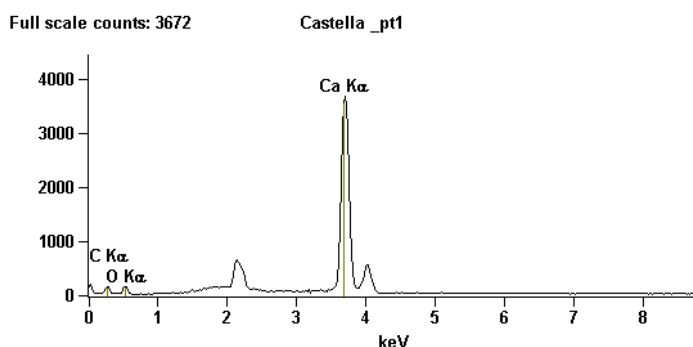
## ANÁLISIS HISTOQUÍMICO

La tinción de los cortes transversales de las hojas con violeta de cresilo permitió detectar gran cantidad de mucílagos, que se tiñen de color azul-violáceo, en las células de la hipodermis (Fig. 59A). Los cortes transversales de hojas y corteza también fueron tratados con solución acuosa de cloruro férrico, observándose depósitos de taninos (compuestos polifenólicos en general) en el parénquima en empalizada de las hojas (Fig. 59 B) y en el parénquima en la corteza externa (Fig. 59D)

La observación de las secciones transversales de hoja y corteza bajo luz polarizada permitió la observación de drusas de oxalato de calcio en el mesófilo de las hojas y en los radios corticales. (Fig. 59C, E). Mediante la técnica de análisis de rayos X con microsonda de electrones se analizaron los cristales presentes en la corteza (Fig. 57, 58), obteniéndose los siguientes resultados:



**Figura58:** Microscopía electrónica de barrido de la corteza de *C. coccinea*. 1: Zona donde se realizó el análisis elemental por EDAX. Accelerating Voltage: 20.0 kV. Magnification: 500



**Figura 59:** Espectro EDAX realizado sobre el punto 1 (drusa). **C:** carbono; **O:** oxígeno; **Ca:** calcio.

**Análisis elemental:**

Filter Fit Chi-squared value: 2.028  
Correction Method: Proza (Phi-Rho-Z)  
Acc.Voltage: 20.0 kV Take Off Angle: 18.1 deg

Element Line	Element Wt. %	Norm. Wt. %	Atom %	Compnd Formula
C K	20.23	20.23	35.45	C
O K	28.65	28.65	37.70	O
Ca K	51.12	51.12	26.85	Ca

El análisis por difracción de rayos X detectó cantidades significativas de calcio, y en menor medida, carbono y oxígeno (Fig. 58), confirmando que los cristales presentes en la corteza de *C. coccinea* serían de oxalato de calcio,  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .



## *Castela tweedii* Planch.



### ***Castela tweedii* Planchon *London J. Bot.* 5:569. 1846.**

*Castela tweedii* var. *macrophylla* Chodat et Hassl., *Bull. Herb. Boiss.* 2 sér. III: 800. 1903; *Castela tweedii* var. *dentata* Engl., *Nat. Pflanzenfam.* 3 (4):219. 1896, ed. 2; 19a: 385. 1931.

Arbusto de 1 a 3 metros de altura con corteza cinérea y longitudinalmente estriada, con espinas axilares rígidas y lisas de unos 0,4 a 3 cm de longitud (Fig. 60A, C). Hojas 3-5 x 1-2,5 cm, cartáceas a sub-coriáceas, cortamente pecioladas, de 2-2,5 cm de longitud, en las axilas de las espinas, glabrescentes, oblongo a elípticos de borde entero a dentado en la mitad apical (Fig. 60B; Fig. 63A, B). Flores verdosas a rosadas, sépalos 4, triangulares, sub-carnosos, pubérulos por fuera; pétalos 4, de 2-3,5 mm de longitud, ovales, obtusos. Estambres 8 con anteras de 1-1,5 mm de largo con filamentos engrosados hacia la base, cubiertos de pelos largos y con anteras de 1,5 mm; en las flores pistiladas reducidos y con anteras estériles. Gineceo sobre un disco glabro, 4 carpelos glabros unidos ligeramente por los estilos, con 4 estigmas largos divergentes; pistilodio rudimentario piloso, a veces ausente. Drupa rojiza, ovoide, de cerca de 1 cm de diámetro, semilla envuelta por el endocarpio coriáceo. (Xifreda y Seo, 2006)

**NOMBRES VULGARES:** “Granadillo”, “Meloncillo” o “Molle sigle”.

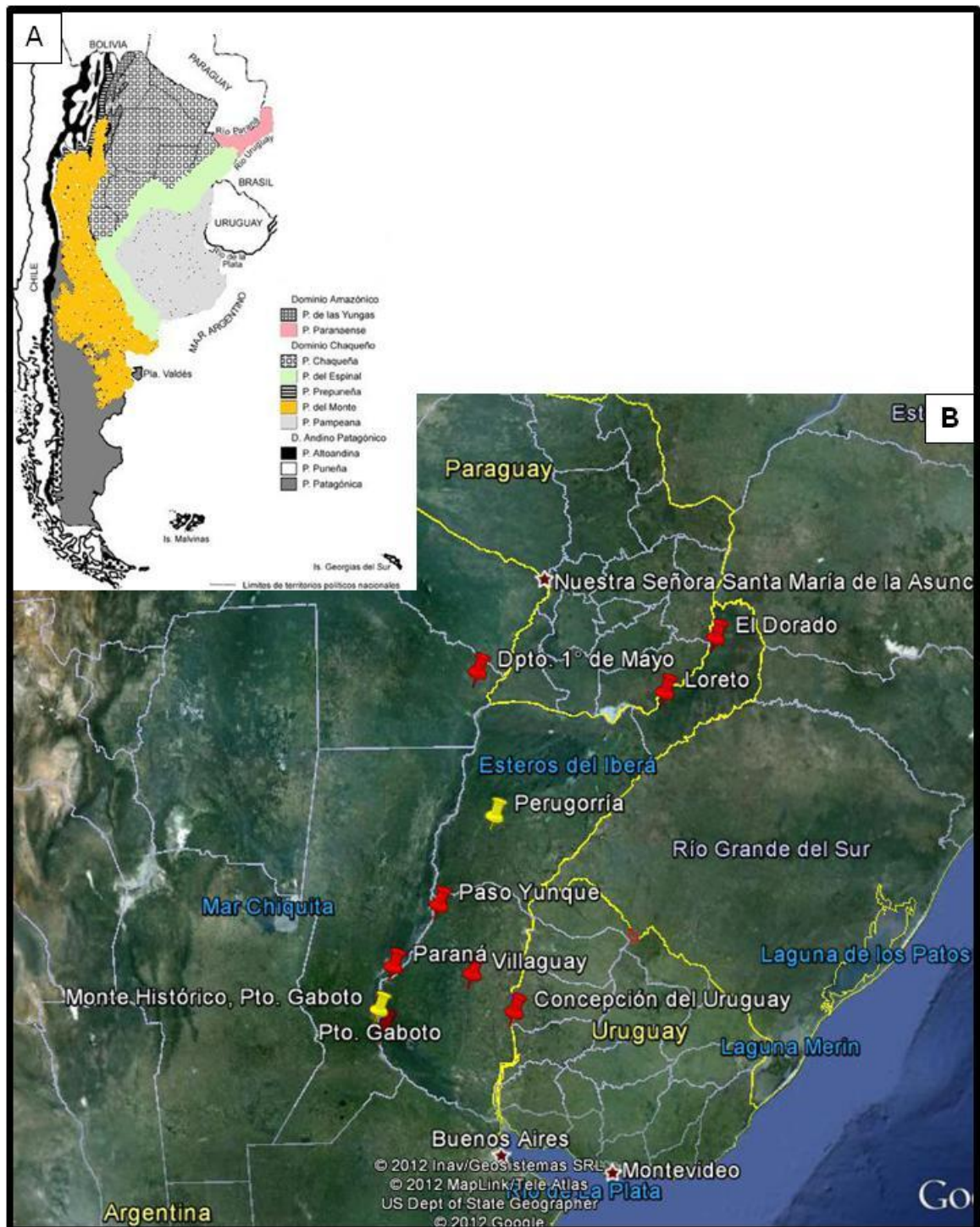
### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.**

Crece en la Argentina en las Provincias biogeográficas: Paranaense (Misiones y el extremo nordeste de Corrientes, en selvas marginales que se extienden hacia el sur formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay), del Espinal (centro de Corrientes y norte de Entre Ríos, centro de Santa Fe y de Córdoba, gran parte de San Luis, centro de La Pampa hasta el sur de Buenos Aires), del Monte (Salta, centro de Catamarca y La Rioja, por el centro y este de San Juan y Mendoza, centro y este de Neuquén, oeste de La Pampa, centro y este de Río Negro, hasta el nordeste de Chubut), y Pampeana (sur de Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba, casi toda Buenos Aires y el este de La Pampa); entre los 0 y 500 m sobre el nivel del mar (Fig. 59). Se extiende al sur de Brasil, centro occidental de Paraguay y Uruguay (Cabrera, 1971; Xifreda y Seo, 2006).

El clima varía entre cálido y húmedo en la provincia Paranaense a seco y fresco en la porción oeste de la provincia del Espinal. Las precipitaciones disminuyen de norte a sur y de este a oeste, desde 1100 a 600 mm anuales (Cabrera, 1971).

*USO VERNÁCULO.*

En la medicina popular Argentina la infusión de las hojas de *C. tweedii* es utilizada contra “dolores de vientre,” diarreas sanguinolentas y otros desórdenes gastrointestinales. Sus frutos para lavados de llagas bucales. (Martinez Crovetto, 1981). Existen referencias históricas al uso medicinal de esta especie (Domínguez, 1939): Bonpland en 1850, recomienda al Gral. Urquiza, el uso de la corteza, hojas y raíz de la granadilla contra la disentería, diarreas y fiebres intermitentes. También la reconoce como tónico gástrico.



**Figura 60: Distribución geográfica de *Castela tweedii* Planch. A: Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *Castela tweedii*. B: ▲ Sitios de colección; ▲ Citas de herbarios y bibliográficas.**



---

**CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

**HOJAS.**

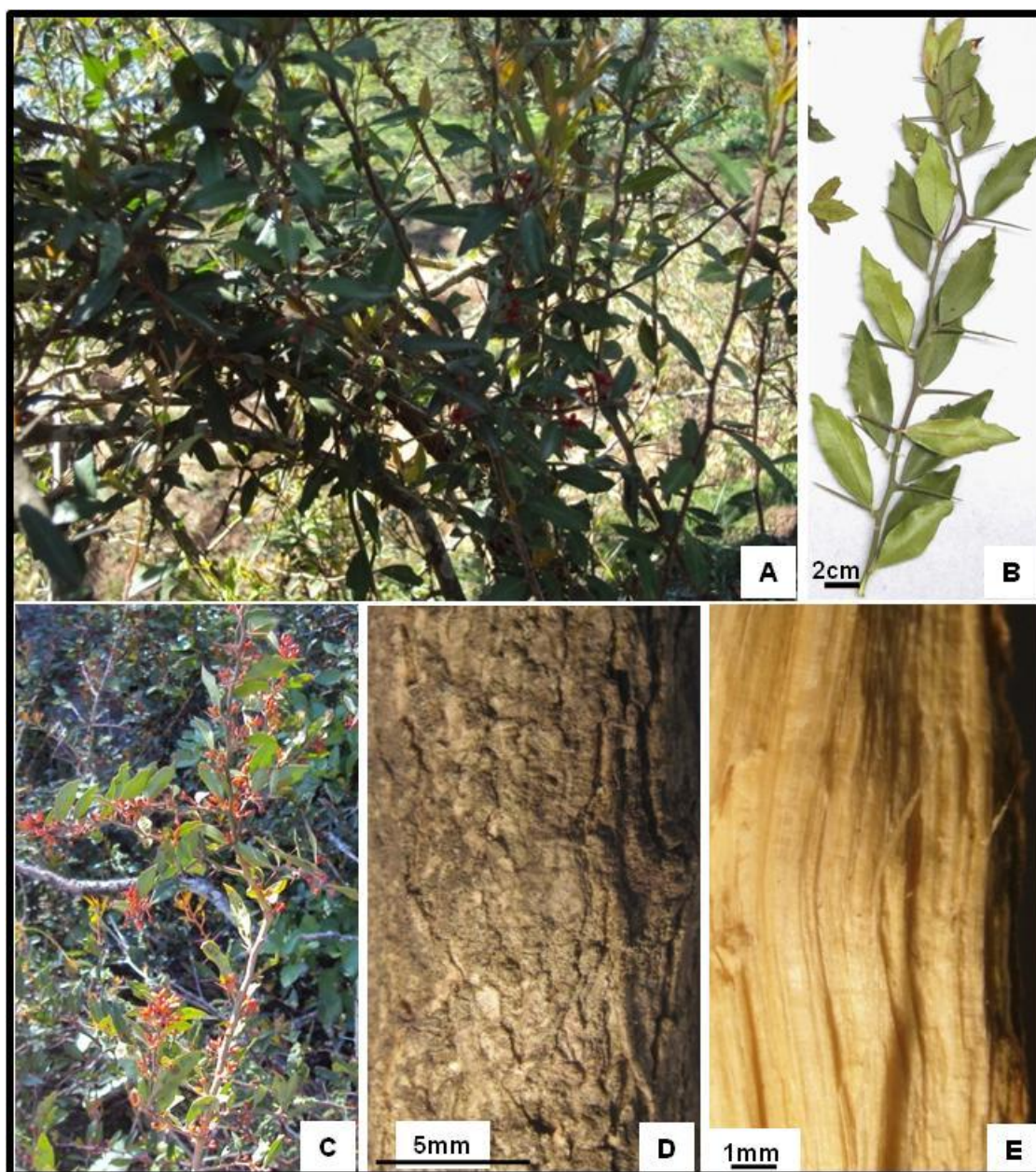
Hojas simples 3 a 5 x 1 a 2,5 cm, cartáceas a subcoriáceas, cortamente pecioladas, en las axilas de las espinas, glabrescentes, oblongo a elípticos de borde entero a dentado en la mitad apical (Fig. 61B; Fig. 64A, B).

**CORTEZA**

La superficie externa de la corteza del tallo es de color pardo amarillento, ligeramente rugosa, con finas estrías longitudinales y abundantes lenticelas (Fig. 61D). La superficie interna es lisa y de color amarillo claro. Posee fractura fibrosa, olor levemente astringente y sabor amargo.

**LEÑO**

El leño en transcorte es de color amarillo claro, brillante, con anillos de crecimiento apenas visibles, delimitados por una franja levemente pardusca (Fig. 61E). La porosidad es difusa, con tendencia a semicircular. No existe diferencia entre duramen y albura.



**Figura 61: Exomorfología de *Castela tweedii* Planch.** A : Aspecto general de un individuo adulto; B: Rama con hojas y espinas; C: Rama con flores; D: Detalle de la corteza; E: Leño.

## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

### HOJA

#### *Lámina en vista superficial.*

Arquitectura foliar: la venación es camptódroma, broquidódroma. Posee de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres. Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas, rectas y curvas. La red vascular es de densidad intermedia reforzada (Fig. 62A; Fig. 64B, C).

*Epidermis adaxial:* Cutícula gruesa y lisa. Células poligonales de paredes anticlinales rectas, elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta tricomas simples unicelulares de paredes engrosadas, que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras (Fig. 62B; Fig. 64D).

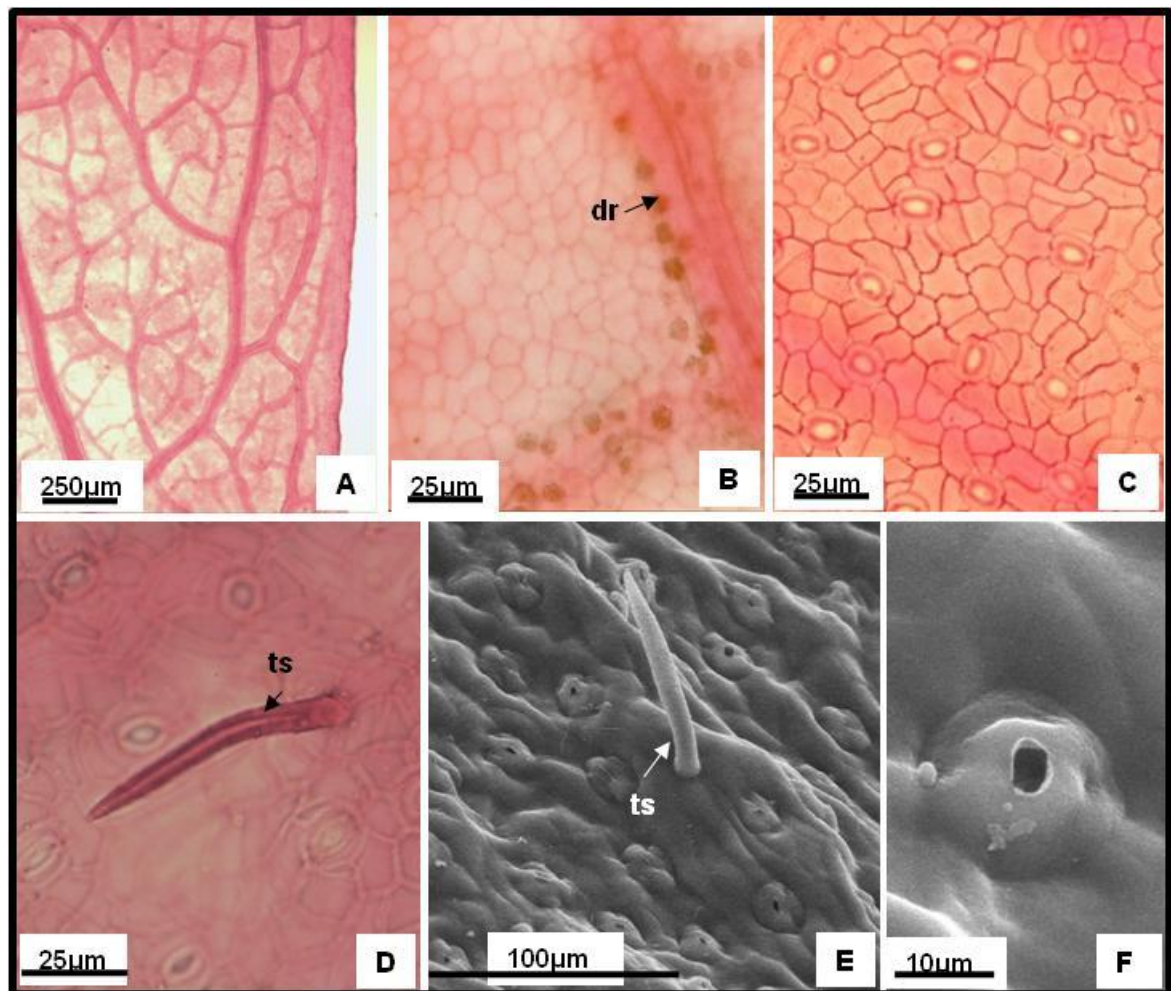
*Epidermis abaxial:* cutícula gruesa y lisa. Células poligonales de menor tamaño que las de la epidermis adaxial, con paredes anticlinales levemente sinuosas. Presenta estomas del tipo anomocítico y tricomas simples de iguales características que los de la epidermis adaxial (Fig. 62C-F; Fig. 63E).

#### *Lámina en corte transversal.*

*Epidermis adaxial:* uniestratificada con cutícula gruesa y lisa. Por debajo se observa una hipodermis muy desarrollada y pluriestratificada por sectores. Sus células contienen mucílagos y, en la capa más cercana al parénquima en empalizada, se observan idioblastos con drusas de oxalato de calcio. (Fig. 63B, D, E).

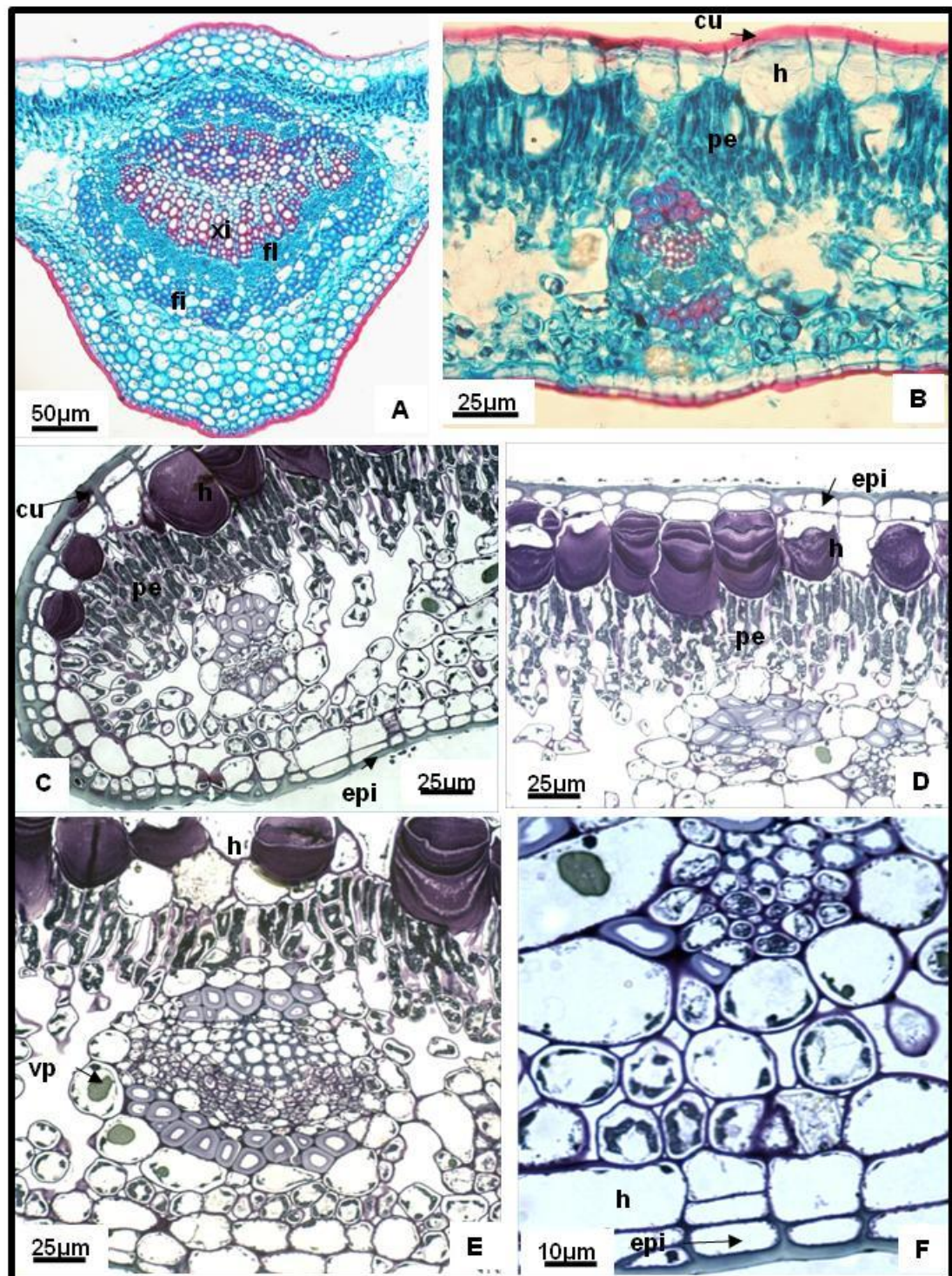
La hoja es hipoestomática. El mesófilo es de estructura dorsiventral, con una a dos hileras de parénquima en empalizada (Fig. 63B, C, E; Fig. 64F, G). El parénquima esponjoso es laxo y contiene drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio (Fig. 63B; Fig. 68C). En posición subepidérmica, reforzando el haz central se observa colénquima del tipo laminar. El nervio medio está formado por 8 a 10 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco y reforzados por una vaina conspicua de fibras blandas (Fig. 63A; Fig. 64F). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 63E; Fig. 63G).

*Epidermis abaxial:* uniestratificada, presencia de una hipodermis con células de menor tamaño que las observadas en la cara adaxial; con cutícula gruesa y lisa (Fig. 63F). Se observa un parénquima en empalizada de células cortas sectorizado.



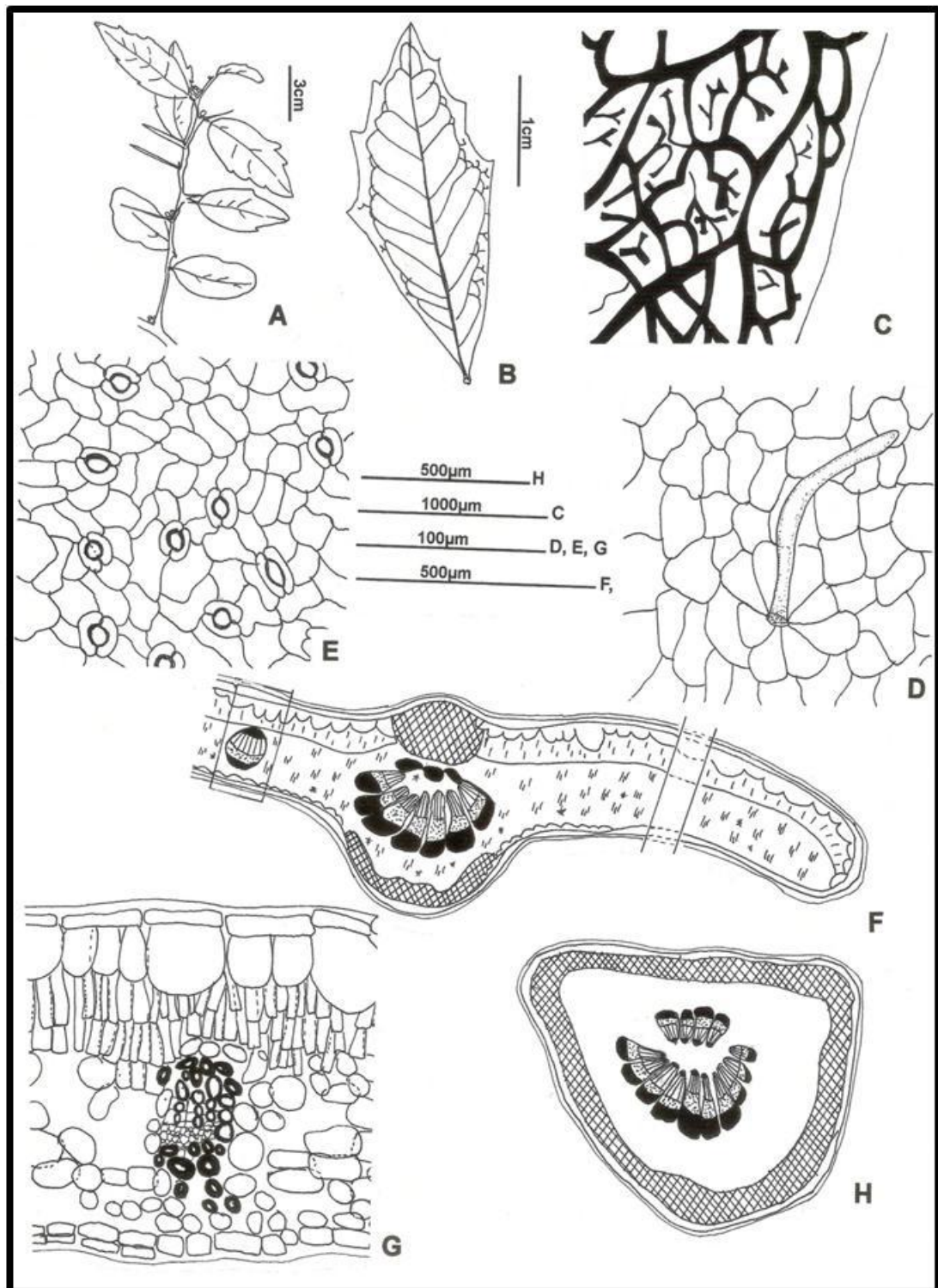
**Figura 62: Fotomicrografía de *Castela tweedii* Planch. Hoja en vista superficial. A: Arquitectura foliar; B: Epidermis adaxial; C-D: Epidermis abaxial; E-F: MEB, E: Epidermis abaxial; F: Estoma. dr: Drusa; ts: Tricoma simple.**





**Figura 63: Fotomicrografía de hoja de *Castela tweedii* Planch. A-F:** Sección transversal. **A:** Nervio medio; **B:** Semilimbo; **C:** Borde del semilimbo; **D:** Semilimbo, detalle de epidermis adaxial e hipodermis; **E:** Semilimbo, nervio secundario; **F:** Detalle de epidermis abaxial e hipodermis. **cu:** Cutícula; **epi:** Epidermis; **fi:** Fibras; **fl:** Floema; **h:** Hipodermis; **pe:** Parénquima en empalizada; **vp:** Vaina parenquimática; **x:** Xilema.





**Figura 64: Fotomicrografía de hoja de *Castela tweedii* Planch.** A: Rama con hojas y espinas; B-C: Morfología y arquitectura foliar; B: Aspecto general; C: Venación del borde y areolas; D-E: Epidermis en vista superficial; D: adaxial; E: abaxial; F-H: Sección transversal; F: Nervio medio; G: Detalle de lo indicado en F; H: Pecíolo.

### PECÍOLO.

En sección transversal es de contorno plano convexo. La epidermis es uniestratificada, con cutícula gruesa y pelos simples similares a los descritos para la lámina. En posición subepidérmica se encuentran 2 a 3 hileras de colénquima laminar. El nervio medio está constituido por numerosos haces vasculares abiertos dispuestos en círculo y reforzados por una vaina de fibras blandas (Fig. 63H).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de las hojas se expresan en la Tabla 15.

### CORTEZA

#### *Corteza externa.*

El ritidoma se halla constituido por 1 a 2 peridermis dispuestas de forma escamosa o imbricada que constan de 15 a 30 hileras de células de súber de dimensiones variables (Fig. 65A, B). Las células del súber, en sección transversal, son poligonales rectangulares de paredes con engrosamiento moderado y heterogéneo, con gran parte de las células con engrosamientos en U (Fig. 65F); en vista superficial son de forma poligonal. La felodermis es uni a biestratificada con escasos cristales poliédricos y drusas de oxalato de calcio. Se observa una región de floema no funcional y parénquima.

#### *Corteza interna*

En el límite del floema funcional se observan numerosos grupos heterogéneos de esclerénquima compuesto, formado por fibras, macroesclereidas y braquiesclereidas, estas últimas con cristales poliédricos de oxalato de calcio incluidos e incrustados en la pared celular (Fig. 65A, C-E). Las fibras floemáticas, de paredes engrosadas y poco lignificadas, se disponen aisladas o agrupadas en bandas tangenciales subestratificadas. Numerosas braquiesclereidas y macroesclereidas pueden observarse aisladas, agrupadas entre sí o asociadas a las fibras (Fig. 65A y C-E).

El floema funcional se halla atravesado por radios 1 a 3 seriados que se ensanchan en la región distal (Fig. 65A); conteniendo abundantes drusas y escasos cristales poliédricos de oxalato de calcio (Fig. 68E). El parénquima radial es homogéneo, se halla constituido por células procumbentes de paredes poco engrosadas, con escasos espacios intercelulares y abundantes drusas de oxalato de calcio. El parénquima axial consta de células alargadas longitudinalmente con morfología variada, contienen abundantes drusas y escasos cristales poliédricos de oxalato de calcio.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 15.

### LEÑO

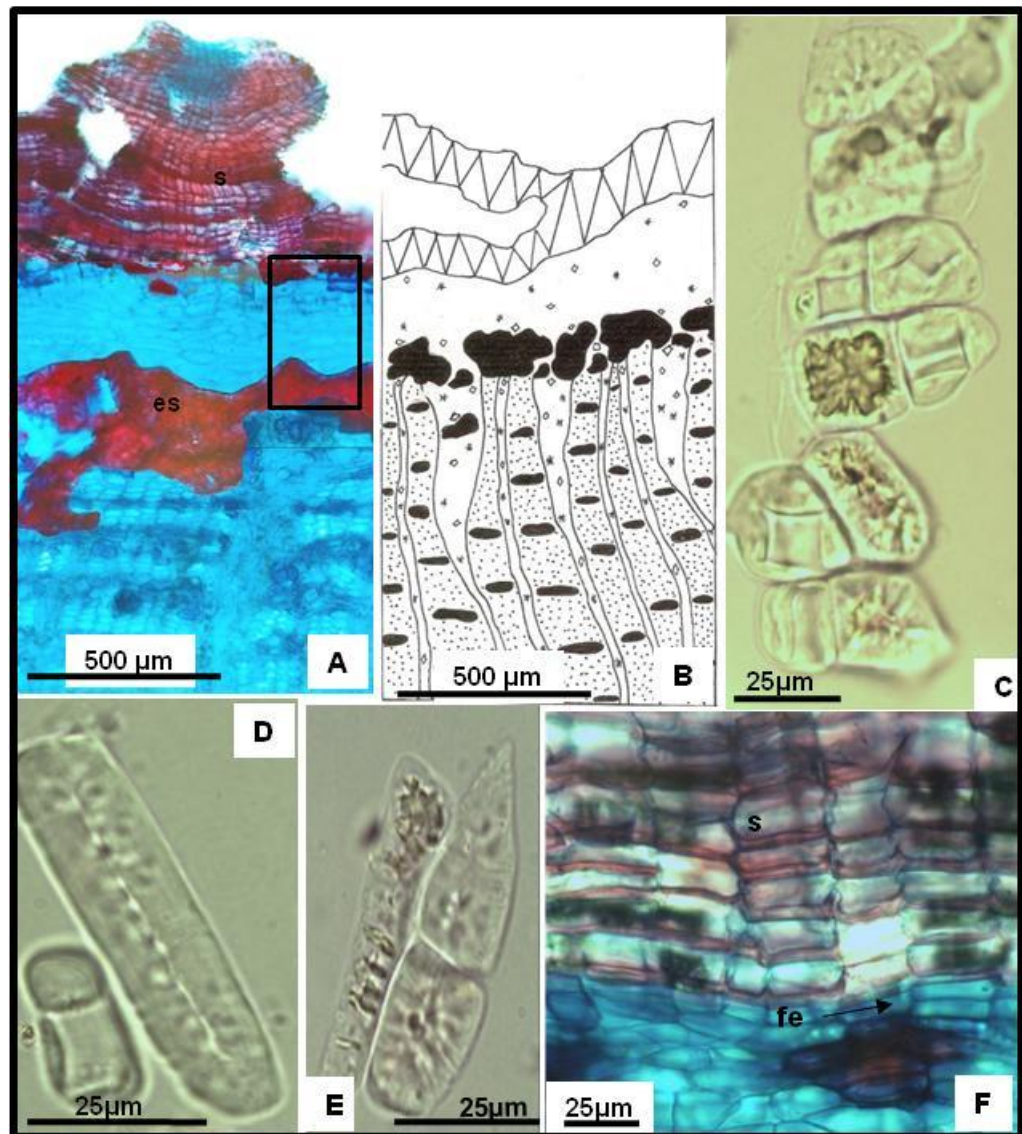
La porosidad es difusa con tendencia a semicircular. El crecimiento es semianular a anular (Fig. 66A, J). Los anillos están delimitados por fibras y fibrotraqueidas reunidas en grupos interradales. Los vasos son de contorno circular con placa de perforación simple, de paredes laterales rectas, a veces con apéndices (Fig. 66E-H). Las puntuaciones intervasculares son areoladas con disposición alterna y abertura de la puntuación inclusa (Fig. 66K). Se disponen en su mayoría con distribución radial, racemiformes, múltiples cortos de 3 a 5 elementos, geminados y escasos solitarios de distribución oblicua (Fig. 66A, J).

Las traquedas y fibrotraquedas son vasicéntricas. Las fibras libriformes poseen fuerte engrosamiento de sus paredes laterales y se encuentran reunidas en grupos inter-radiales con disposición estratificada (Fig. 66D).

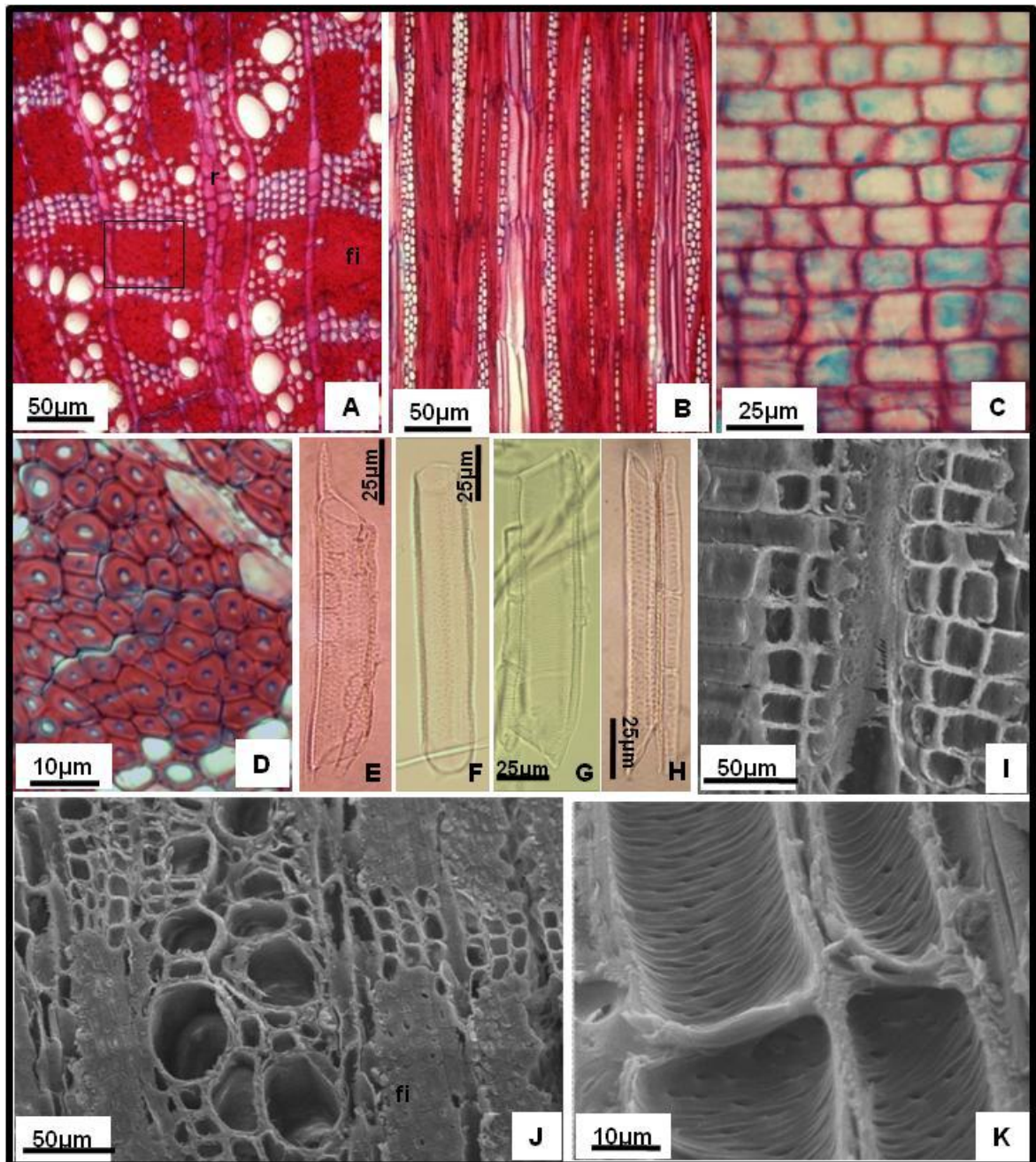
El parénquima axial es paratraqueal vasicéntrico, generalmente confluyente, formado por 3 a 4 células por banda de parénquima. El sistema radial es homogéneo, comprende radios uni a pluriseriados constituidos por células procumbentes (Fig. 66B, C, I).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 15.





**Figura 65: Fotomicrografía de la corteza de *Castela tweedii* Planch.**  
**A-B y F:** Sección transversal; **A:** Vista general; **B:** Representación esquemática; **C-E:** Material macerado; **C:** Braquiesclereidas con cristales incluidos; **D:** Macroescleréida; **E:** Braquiescleréidas; **F:** Corteza externa; **es:** Esclerenquima; **fe:** Felodermis, **fi:** Fibras; **s:** Súber.



**Figura 66: Fotomicrografía del leño de *Castela tweedii* Planch.** **A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal tangencial; **C:** Sección longitudinal radial; **D:** Detalle de lo indicado en **A**; **E-H:** Material macerado, miembros del vaso; **I-K:** MEB; **I:** Sección longitudinal radial, radio homocelular; **J:** Sección transversal; **K:** Sección longitudinal, vasos. **fi:** Fibras; **r:** Radio.

Hoja	Índice de estomas		11.5 ± 1.9
	Estomas x mm <sup>2</sup>		353,5 ± 71.1
	Índice de empalizada		9.3 ± 1.3
	Tricomas simples x mm <sup>2</sup>		47,8 ± 1
	Longitud de tricomas simples (µm)		116.8 ± 25.7
Corteza	Latitud células de súber en transcorte		15±4
	Longitud células de súber en transcorte		30,0±6,8
	Diámetro células de. súber		12,9±2,7
	Diámetro braquiesclereidas		22,4±4,1 (14-30)
	Long. Macroesclereidas		31,4±2,8 (28-38)
	Long. Fibroesclereidas		458,0 ± 63,5 (352-560)
	Long. Fibras no septadas	Cortas (48%)	1125,4 ± 296,7 (880-1280)
Largas (52%)		1657,4 ± 223,3 (1400-2000)	
Leño	Longitud elementos del vaso		203,8±32,4 (152-256)
	Diámetro elementos del vaso		21,8 ± 5,6 (18-32)
	Longitud fibras no septadas	Cortas (45%)	594,1 ± 150,9 (336-784)
		Largas (55%)	900,1 ± 137,8 (800-1400)
	Latitud de fibras		9,8±1,6
	Vaso x mm <sup>2</sup>		273,4 ± 44,6
	Altura de los radios	Unicelulares	5±2
		Pluricelulares	Cortos 11 ± 4 Largos 27 ± 5
	Índice de vulnerabilidad		0.08
Índice de mesomorfía		16.3	

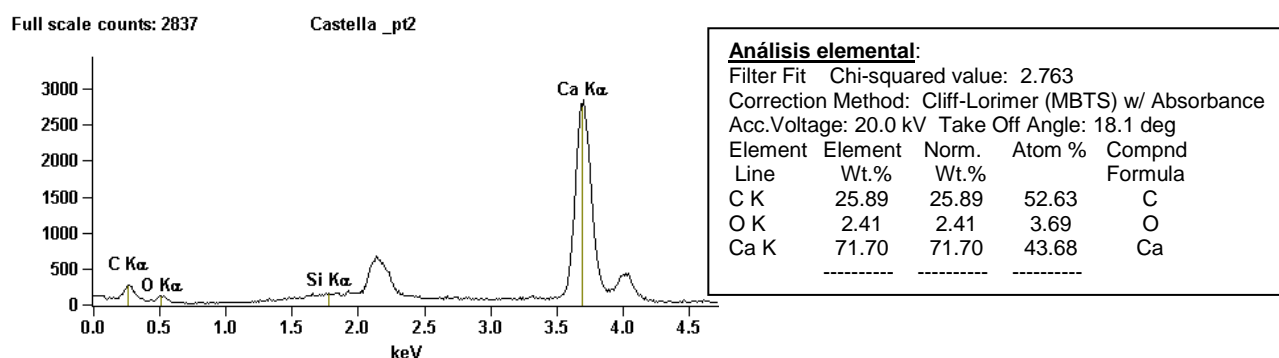
**Tabla 15: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Castela tweedii* Planch.;** los resultados se expresan como porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.

## ANÁLISIS HISTOQUÍMICO

La tinción de los cortes transversales de hojas y corteza con solución acuosa de cloruro férrico permitió detectar taninos en el parénquima en empalizada de las hojas y en el parénquima de la corteza externa (Fig. 68A, D).

Se constató la presencia de mucílagos en las células hipodérmicas (Fig. 66B) al teñir los cortes transversales de hojas con violeta de cresilo (Fig. 68B).

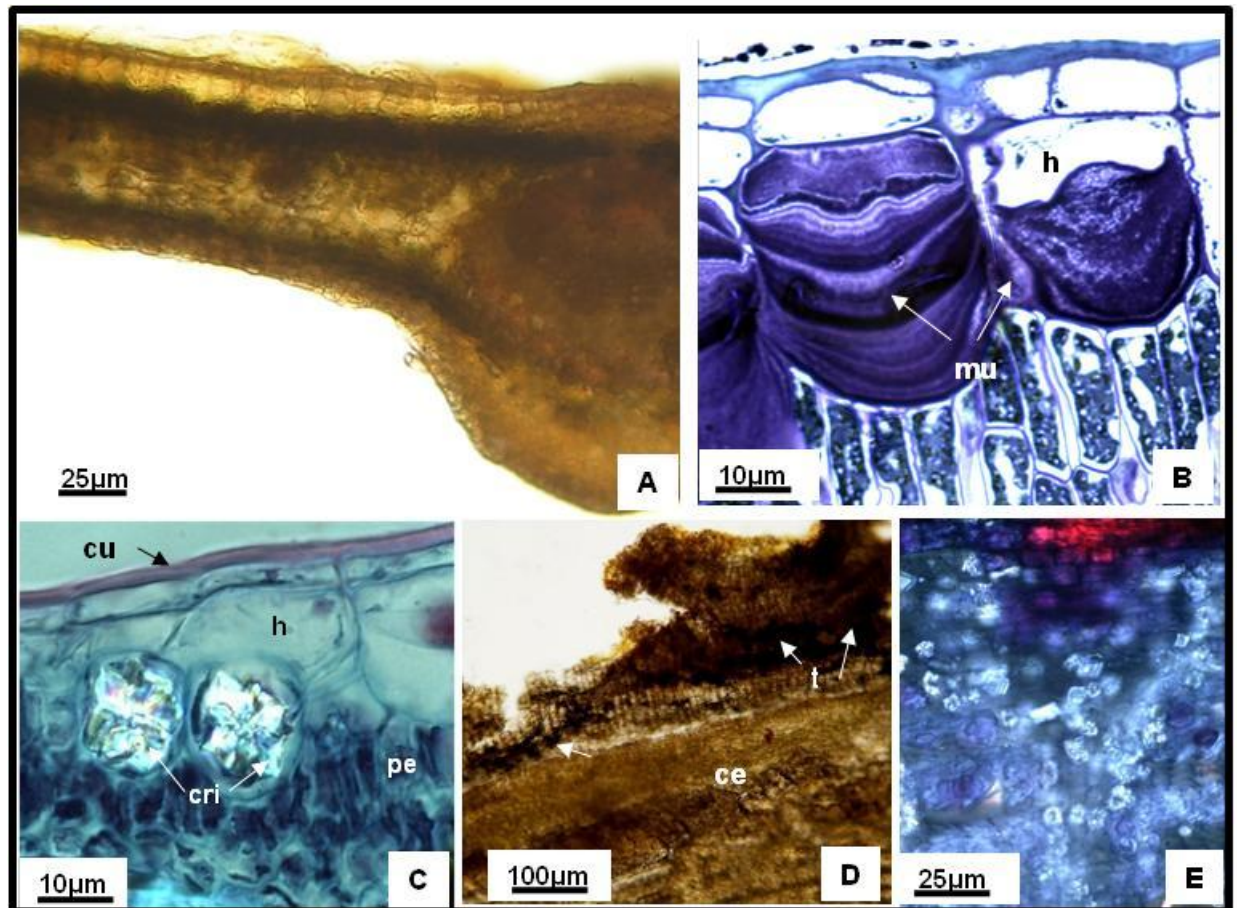
La observación de los cortes bajo luz polarizada permitió la detección de drusas de oxalato de calcio en el mesófilo de las hojas y en el parénquima cortical y radial en la corteza (Fig. 68C, D). El análisis elemental por difracción de rayos X de los cristales presentes en la corteza detectó cantidades significativas de calcio, y en menor medida, carbono y oxígeno, confirmando que los cristales serían de oxalato de calcio:  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  (Fig. 67).



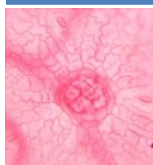
**Figura 67:** Espectro EDAX realizado sobre los cristales en la corteza de *C. tweedii*.

**C:** carbono; **O:** oxígeno; **Ca:** calcio.





**Figura 68: Análisis Histoquímico de *Castela tweedii* Planch.** A-C: Hoja en sección transversal; A: Tinción con solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%, semilímbo; B: Tinción con violeta de cresilo, hipodermis; C: Observación con luz polarizada; D-E: Corteza en sección transversal; D: Tinción con solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%, corteza externa; E: Observación con luz polarizada. ce: Corteza externa; cri: Cristales de oxalato de calcio; cu: Cutícula; h: Hipodermis; mu: Mucilagos; pe: Parénquima en empalizada; t: Taninos.



## *Picramnia parvifolia* Engl.



***Picramnia parvifolia* Engl., en Martius, *Fl. Bras.* 12(2): 242, pl. 49. 1874**

*Picramnia regnelli* auct. non. Engl., Sleumer *Lillioa* 26:16. 1953.

Arbustos a subarbustos de 1,5 a 4 metros de altura. Corteza cinérea, rugosa, con muchas lenticelas de color claro. Hojas imparipinadas, 10-22 cm long., con pecíolo de 1-4 mm, con 7-15 folíolos de 2-10 x 0,8-2cm, alternos a subopuestos, membranáceos, oblongo-elípticos a oblonga-lanceolada; con pecíolos de 1-2mm de long. (Fig. 70A-C). Inflorescencia en panículas terminales de 7-15cm; laxamente ramificadas, colgantes, con el eje cortamente piloso; brácteas linear lanceoladas de cerca de 1mm, densamente pilosas. Flores sésiles a cortamente pediceladas, rojizas, trímeras, las estaminadas de cerca de 1,5mm de largo, las pistiladas de cerca de 4mm. Sépalos oval-obtusos, con pelos en la región central de la cara externa. Pétalos largamente oboval-espátulados a obcordados, rojizos. Estambres 3, tan largos como los pétalos. Disco profundamente 3-lobado. Ovario globoide, densamente tomentoso, 2-locular; estigmas 2, divergentes. Fruto baya (Fig. 70B, C).

**NOMBRES VULGARES:** No conocidos en Argentina. En Brasil se la conoce popularmente como “palo amargo” o “cedrillo”

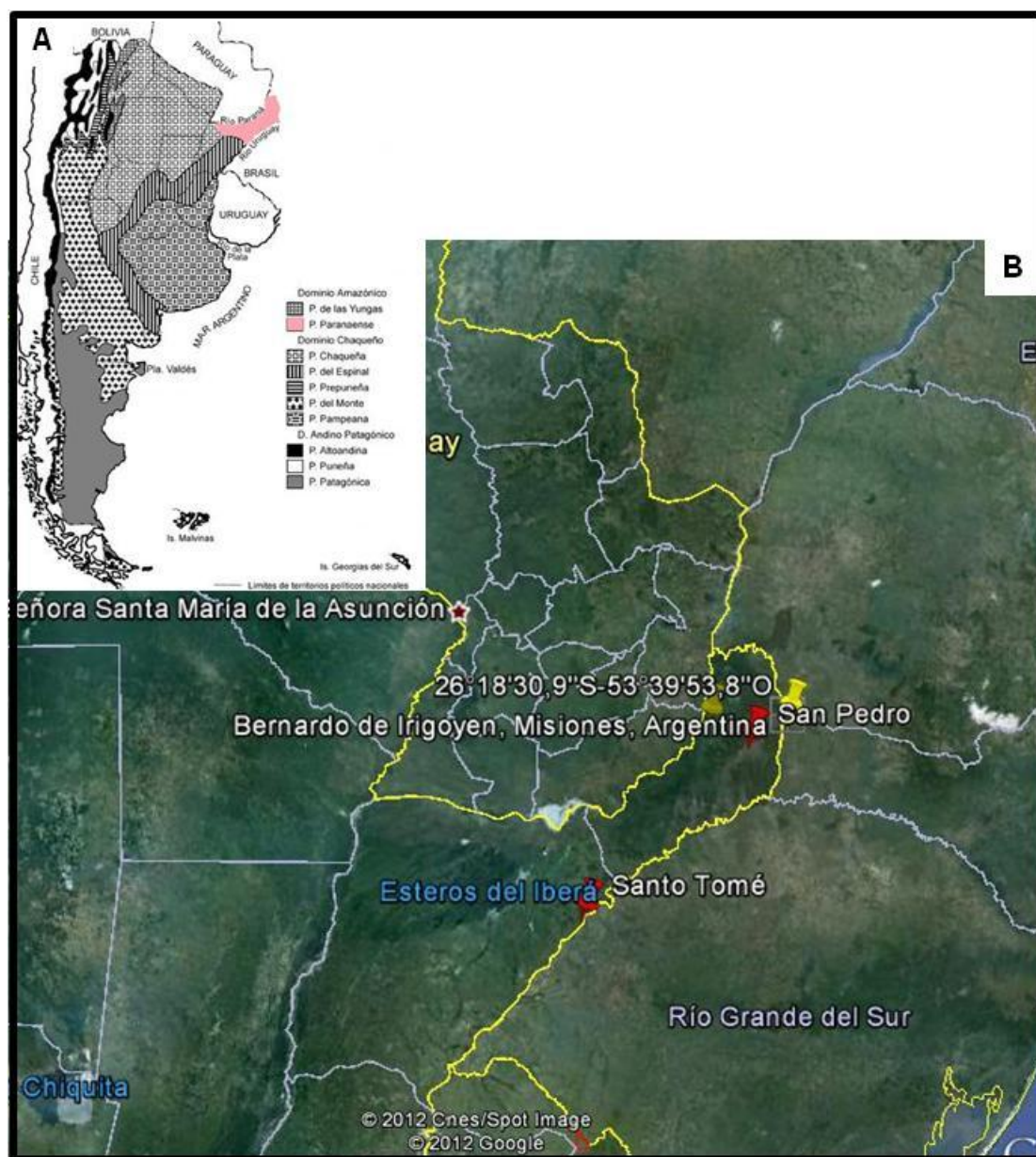
### *DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.*

Se encuentra en la provincia biogeográfica Paranaense (Misiones y el extremo nordeste de Corrientes, con selvas marginales que se extienden hacia el sur formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay) entre los 0 a 500 m.s.m (Fig. 67); se extiende a la parte meridional de América tropical, en Brasil desde Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul y en Paraguay meridional (Xifreda y Seo, 2006).

El clima es cálido y húmedo, con precipitaciones durante todo el año, que varían entre los 1500 y 2012 mm anuales. La temperatura media anual varía entre los 20° y 21°C, siendo los inviernos suaves y los veranos no excesivamente cálidos debido a las frecuentes lluvias (Cabrera, 1971).

### *USO VERNÁCULO.*

No se registra en la bibliografía consultada ningún uso medicinal para esta especie en nuestro país; sin embargo por comunicaciones orales, se sabe que se la comercializa indistintamente con las otras especies aquí analizadas. La infusión de sus hojas es ampliamente utilizada en la medicina herbaria brasileña para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como tónico y febrífugo (Popinigis y col., 1980).



**Figura 69: Distribución geográfica de *Picramnia parvifolia* Engl. A:** Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *Picramnia parvifolia*; **B:** ▲ Sitios de colección; ▲ Citas de Herbarios y Bibliográficas.

---

**CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

**HOJA.**

Las Hojas son compuestas, imparipinnadas pecioladas, con 7-15 folíolos peciolados, de 2-10 cm. de long. por 0,8-2 cm. lat., alternos a subopuestos, membranáceos, oblongo-elíptico a oblongo lanceolados, margen poco revuelto, ápice subacuminado o más raramente obtuso, base aguda y asimétrica, a veces oval obtusa (Fig. 70A-C; Fig. 73A, B).

**CORTEZA.**

De color gris pardusco. Posee abundantes lenticelas con importante reborde (Fig. 70D). Posee fractura entera, olor característico y sabor amargo.

**LEÑO.**

El leño es de color amarillo pardusco (Fig. 70E). No se diferencian albura y duramen. En sección transversal los poros no son visibles y los anillos de crecimiento son apenas perceptibles.





**Figura 70: Exomorfología de *Picramnia parvifolia* Engl. A: Hojas; B-C: Rama con frutos; D: Detalle de la corteza; E: Leño.**

## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

### HOJA

#### *Lámina del folíolo en vista superficial*

**Arquitectura foliolar:** la venación es camptódroma, broquidódroma (Fig. 73B). Poseen de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinnadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados (Fig. 71A; Fig. 73 B, C). Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas y rectas o curvas. La red vascular es de densidad intermedia.

**Epidermis adaxial:** cutícula medianamente gruesa y lisa. Células poligonales de paredes anticlinales sinuosas, más grandes que las de la epidermis abaxial y elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta tricomas simples, unicelulares, de paredes gruesas, que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras y bordes de los folíolos (Fig. 71C; Fig. 73D, F).

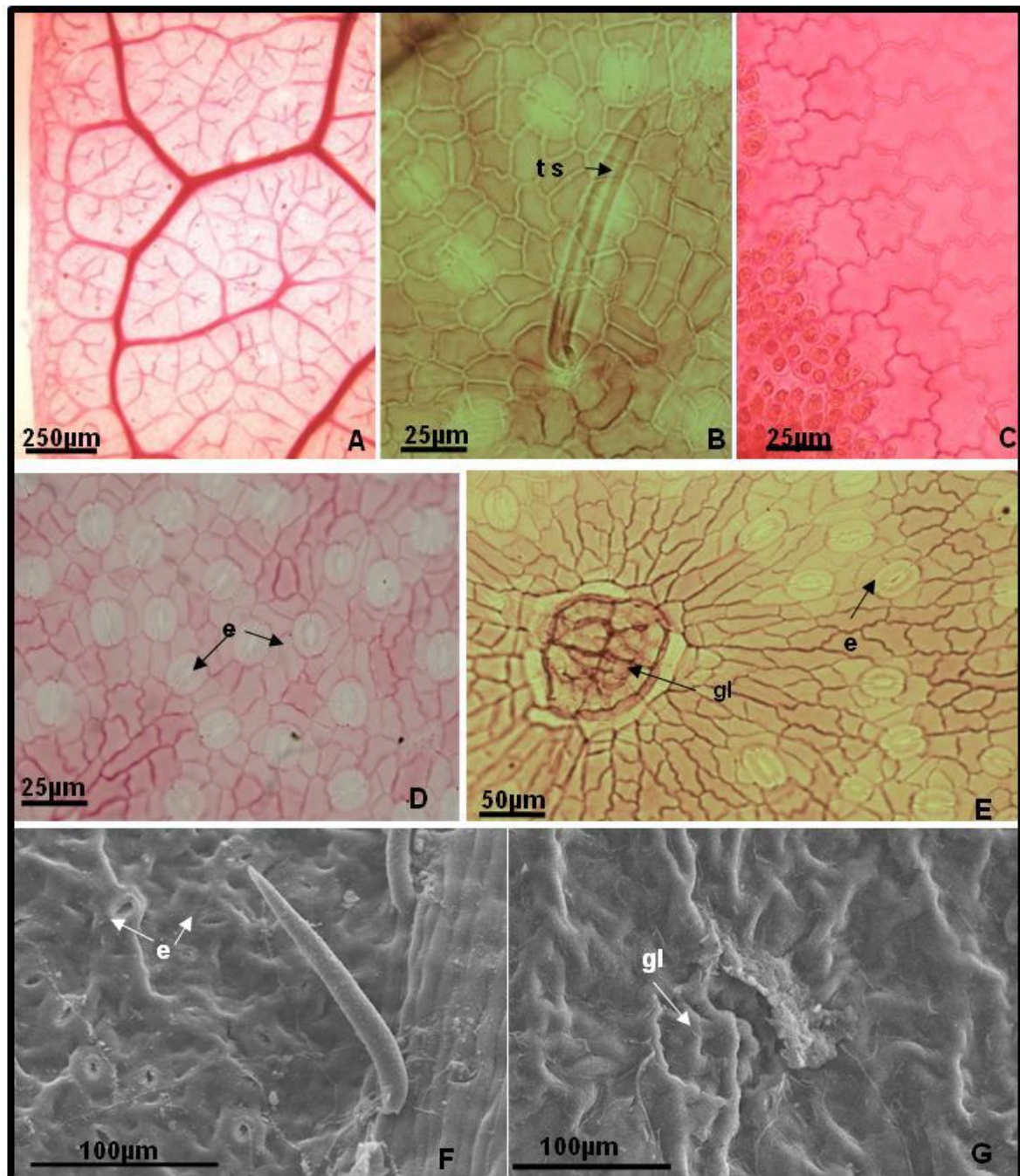
**Epidermis abaxial:** cutícula lisa. Células poligonales de paredes anticlinales levemente sinuosas, y elongadas sobre el nervio medio. Estomas del tipo anomocítico al mismo nivel que las restantes células epidérmicas. Se observan tricomas simples, similares a los de la epidermis adaxial, y glándulas secretoras pluricelulares dispersas en el limbo foliolar (Fig. 71B, D, E, F, G; Fig. 73D, E, G).

#### *Lámina del folíolo en corte transversal.*

**Epidermis adaxial:** uniestratificada con cutícula lisa y gruesa (Fig. 72B, C, D).

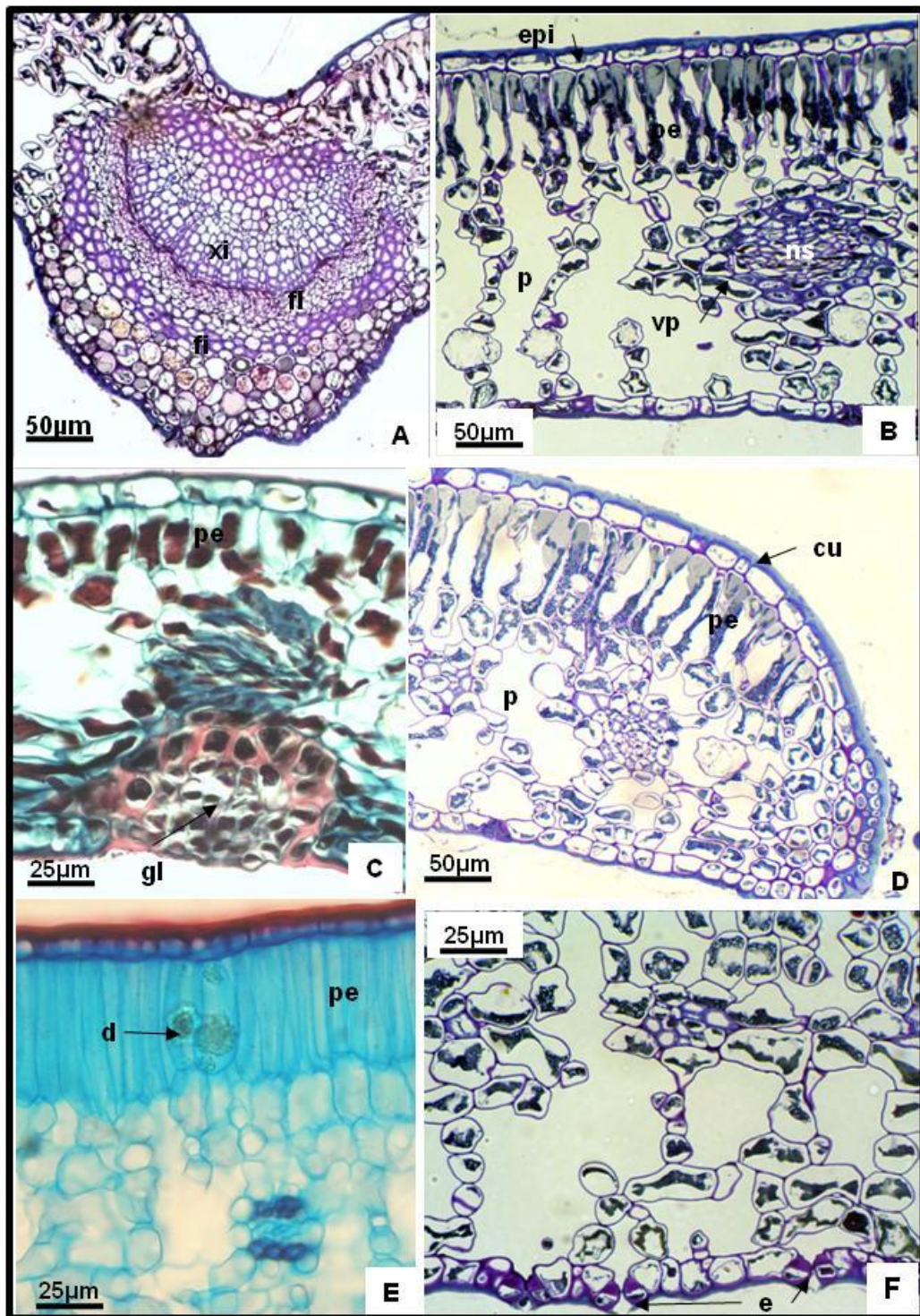
La hoja es hipoestomática. El mesófilo es de estructura dorsiventral, con 1 hilera de parénquima en empalizada de células largas (Fig. 72B, C, D; Fig. 73H, I). El parénquima esponjoso es laxo y posee cristales poliédricos y drusas (Fig. 72B; Fig. 76A). En posición subepidérmica la vena media se halla reforzada por colénquima de tipo laminar del lado adaxial y abaxial (Fig. 72A; Fig. 73H). El nervio medio está constituido por 9 a 12 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco, acompañados por una vaina conspicua de fibras (Fig. 72A; Fig. 73H). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 72B; Fig. 73I).

**Epidermis abaxial:** uniestratificada, con cutícula gruesa y lisa (Fig. 72F). Se observa la presencia de glándulas pluricelulares de secreción sobre el lado abaxial del folíolo, abarcando parénquima y epidermis (Fig. 72C).



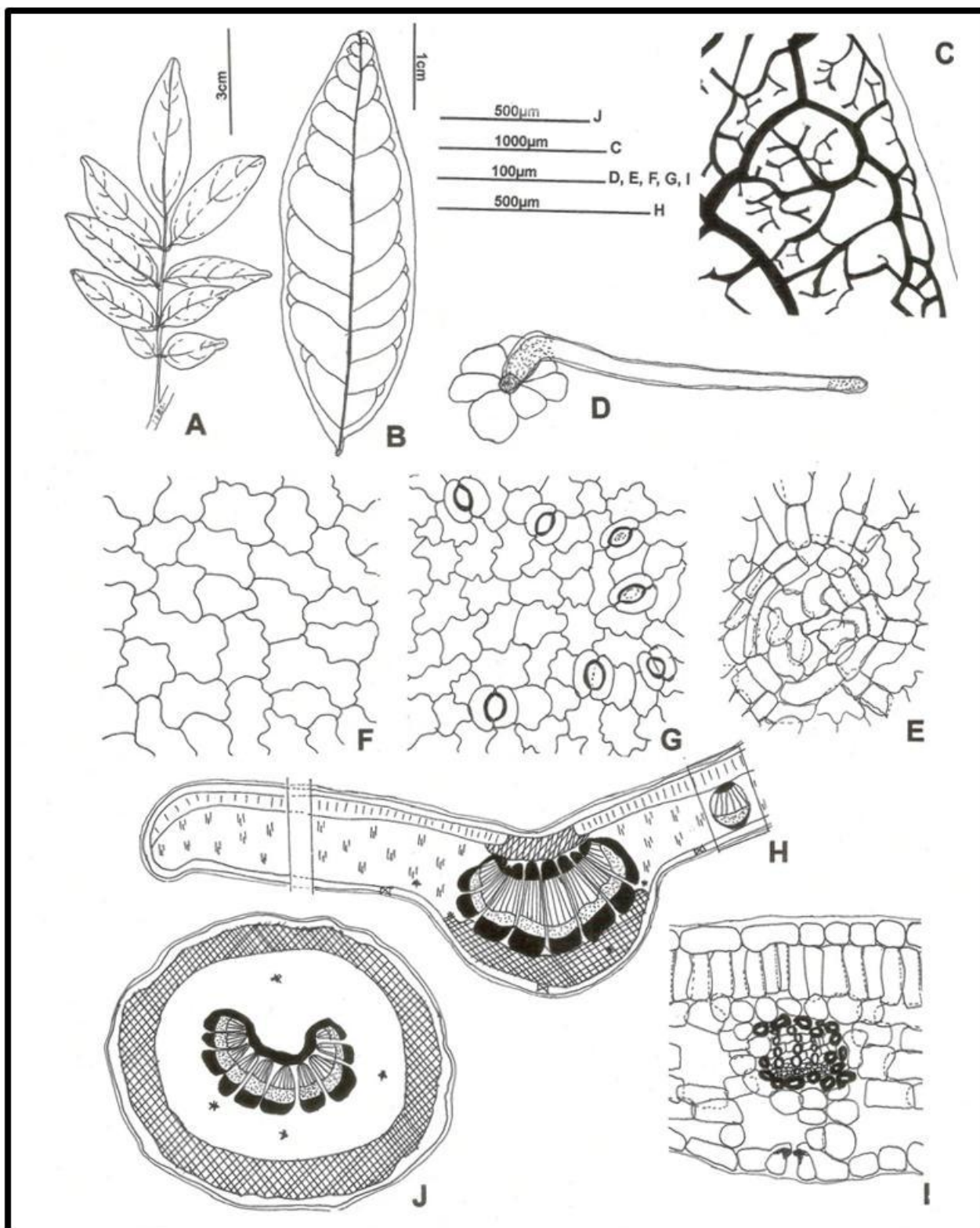
**Figura 71: Fotomicrografía de hoja de *Picramnia parvifolia* Engl. A-G: Epidermis en vista superficial; A: Arquitectura foliolar; B: Epidermis abaxial; C: Epidermis adaxial; D y E: Epidermis abaxial; F-G: MEB, epidermis abaxial. e: Estomas; gl: Glándula pluricelular; ts: Tricoma simple unicelular.**





**Figura 72: Fotomicrografía de hoja de *Picramnia parvifolia* Engl. A-F:** Sección transversal; **A:** Nervio medio; **B y C:** Semilimbo; **D:** Borde del semilimbo; **E:** Semilimbo cara adaxial; **F:** Semilimbo, cara abaxial; **cu:** Cutícula; **d:** Drusas; **e:** Estomas; **epi:** Epidermis; **fi:** Fibras; **fl:** Floema; **gl:** Glándula pluricelular; **ns:** Nervio secundario; **p:** Parénquima esponjoso laxo; **pe:** Parénquima en empalizada; **vp:** Vaina parenquimática; **xi:** Xilema.





**Figura 73: Micrografía de hoja de *Picramnia parvifolia* Engl. A: Morfología foliar; B-C: Arquitectura foliolar; B: Aspecto general; C: Venación del borde y areolas; D-G: Epidermis en vista superficial; D: Tricoma simple; E: Glándula pluricelular; F-G: Epidermis en vista superficial; F: adaxial; G: abaxial; H-J: Sección transversal; H: Nervio medio; I: Detalle de lo indicado en H; J: Pecíolo.**

### **PECIOLULO.**

En sección transversal es de contorno circular a oval. La epidermis es uniestratificada, con cutícula delgada, y tricomas unicelulares, similares a los descritos para los folíolos. En posición subepidérmica se localizan 3-4 hileras de colénquima laminar. El parénquima fundamental contiene numerosos idioblastos con drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio. El sistema vascular del nervio medio adopta forma de arco abierto reforzado con una vaina de fibras (Fig. 73J).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico para las hojas se expresan en la Tabla 16

### **CORTEZA.**

#### *Corteza externa*

Constituida por una sola peridermis exfoliante con 8 a 12 capas de células de súber de dimensiones variables. Células del súber de forma poligonal rectangular en sección transversal, con engrosamiento leve y heterogéneo en sus paredes. Capas de células de súber con paredes con engrosamiento mediano y heterogéneo alternan con capas de células sin engrosamiento; las basales con engrosamientos en forma de “U” o lignificadas (Fig. 74A, B). En superficie, las células suberosas se observan poligonales isodiamétricas, si dejar espacios intercelulares. Felodermis pluriestratificada. Se observa floema no funcional y parénquima con abundantes cristales poliédricos, drusas de oxalato de calcio y aisladas esclereidas (Fig. 74A, B).

#### *Corteza interna*

En el límite del floema funcional se observan grupos heterogéneos de diferentes dimensiones de esclerénquima compuesto formado por fibras septadas, macroesclereidas, braquiesclereidas y fibroesclereidas (Fig. 74A, C-H). Las fibras floemáticas son de paredes medianamente engrosadas y generalmente septadas (Fig. 74H). Se observan braquiesclereidas de paredes engrosadas con cristales poliédricos incluidos (Fig. 74F y G).

El floema funcional se halla surcado por radios 1-2-seriados. El parénquima radial está constituido por células parenquimáticas procumbentes y erectas, de paredes con engrosamiento mediano, sin espacios intercelulares y abundantes campos de puntuaciones. Contienen aislados cristales poliédricos de oxalato de calcio. El parénquima axial posee abundantes cristales y microcristales de oxalato de calcio.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 16.

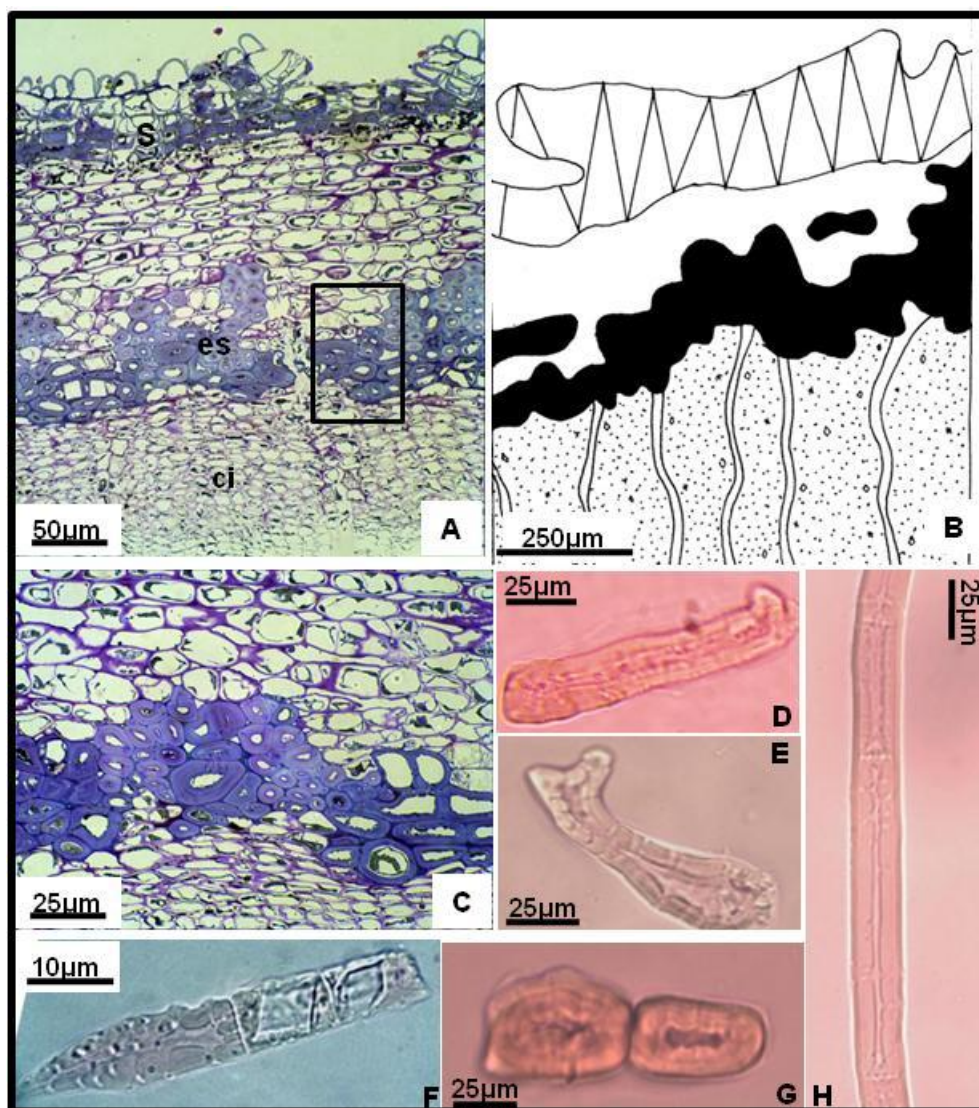
### **LEÑO**

El leño es de crecimiento semi-anular con porosidad difusa uniforme (Fig. 75A, I). Los vasos son de contorno circular a oval, con placa perforada simple oblicua con apéndices conspicuos y puntuaciones intervasculares areoladas alternas con apertura de la puntuación inclusa (Fig. 75D-G, K). Se disponen en forma radial en su mayoría, geminados, racemiformes, y múltiples cortos de 2 a 6, y múltiples largos de 6 a 12 (Fig. 75A, I).

Las fibras xilares, traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas interradales presentan paredes laterales medianamente engrosadas. Se observan fibras xilares fusiformes, septadas y no, de disposición no estratificada, con puntuaciones simples oblicuas (Fig. 75H).

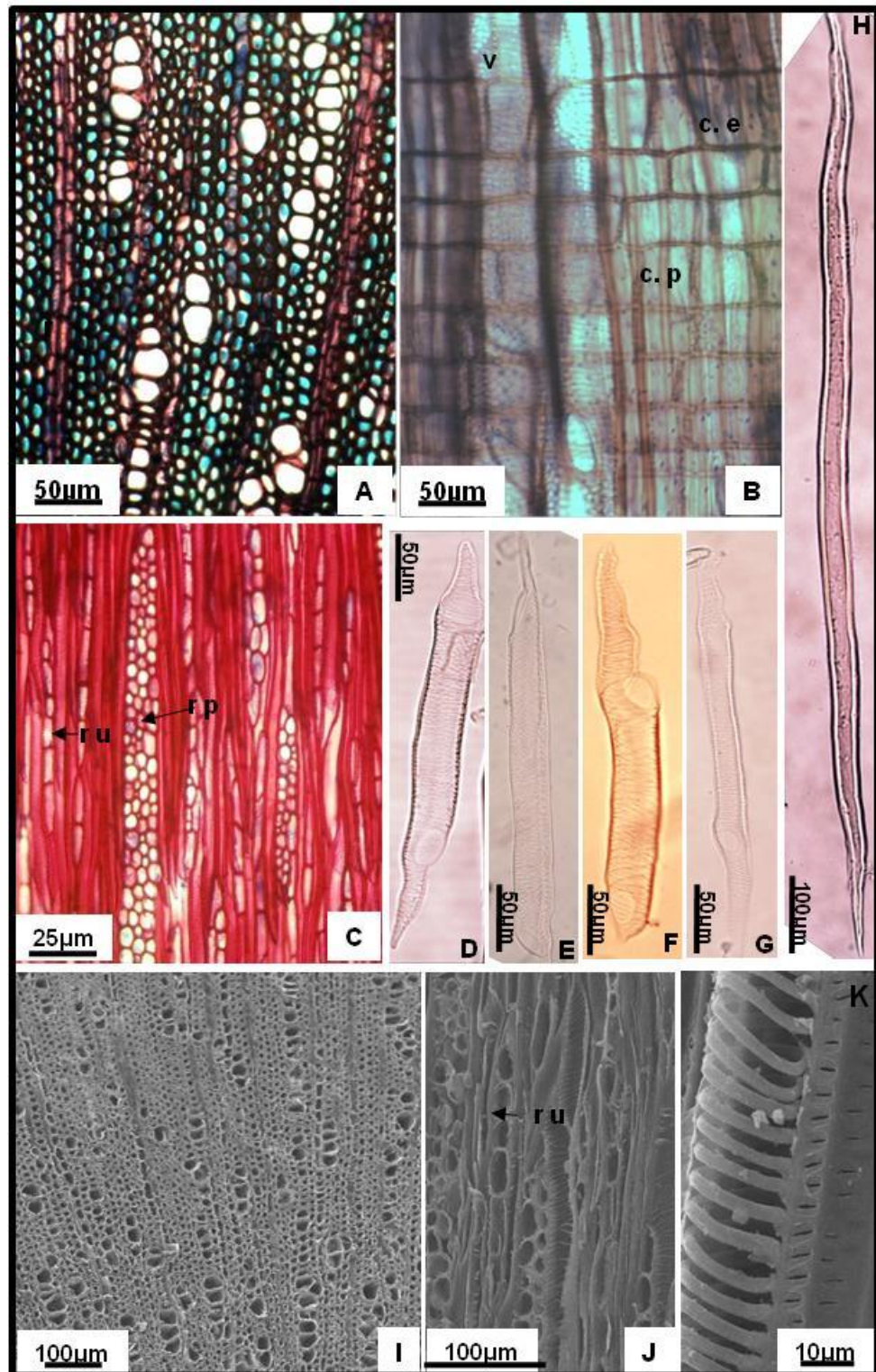
El parénquima xilemático axial es casi nulo con tendencia a metatraqueal en sección transversal. El sistema radial está constituido por radios 1 a 3 seriados, no estratificados y heterocelulares, con 1 a 5 células procumbentes en el cuerpo del radio y 2 a 4 o más de 4, células erectas en los márgenes de los mismos (Fig. 75B, C). Las células radiales son de paredes medianamente engrosadas, con puntuaciones simples y no dejan espacios intercelulares.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 16.



**Figura 74: Fotomicrografía de corteza de *Picramnia parvifolia* Engl. A-C:** Sección transversal; **A:** Vista panorámica; **B:** Representación esquemática; **C:** Detalle de lo indicado en A; **D-H:** Material macerado; **D:** Macroscleireida; **E:** Braquiescleireida con proyecciones; **F:** Macroscleireida y Braquiescleireidas con cristales poliédricos incluidos; **G:** Braquiescleireidas; **H:** Fibra septada. ci: Corteza interna; es: Esclerenquima compuesto; s: Súber





**Figura 75: Fotomicrografía de leño de *Picramnia parvifolia* Engl.**  
**A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal radial; **C:** Sección longitudinal tangencial; **D-H:** Material macerado: **D-G:** Miembros del vaso; **H:** Fibra; **I-K:** MEB; **I:** Sección transversal; **J:** Sección longitudinal tangencial; **K:** Sección longitudinal, vaso anillado. **ce:** Células erectas; **cp:** Células procumbentes; **rp:** Radio pluriseriado; **ru:** Radio uniseriado; **v:** Vaso

Hoja	Índice de estomas		12 ± 2
	Estomas x mm <sup>2</sup>		283 ± 57
	Índice de empalizada		6,4 ± 1,0
	Tricomassimples x mm <sup>2</sup>		7±4
	Longitud de tricomas simples (µm)		231,2 ± 18,3
Corteza	Latitud células de súber en transcorte		10±5
	Longitud células de súber en transcorte		40,6 ±4,7
	Diámetro células de. súber		35,2±4,5
	Diámetro braquiesclereidas		30,5 ± 7,3 (20-40)
	Long. Macroesclereidas		82,2 ± 26,6 (50-128)
	Long. Fibroesclereidas		342,9 ± 177,9 (180-608)
	Long. Fibras no septadas (37%)	Cortas ()	824,8 ± 109,7 (608-900)
		Largas ()	1410,0 ± 292,0 (1200-1820)
	Long. Fibras septadas (63%)	Cortas	833,3 ± 118,9 (648-980)
		largas	1241,5 ± 210,1 (1000-1600)
Leño	Longitud elementos del vaso		375,1 ± 94,3 (240-512)
	Diámetro elementos del vaso		25,4 ± 5,6 (12-34)
	Longitud fibras no septadas (67%)		604,1 ± 59,7 (504-792)
	Long. Fibras septadas (33%)		598,6 ± 124,4 (440-800)
	Latitud de fibras		16,9±2,5
	Vaso x mm <sup>2</sup>		24,4 ± 5,7
	Altura de los radios	Unicelulares	10±2
		Pluricelulares	25±8
	Índice de vulnerabilidad		1,04
	Índice de mesomorfía		390,5

**Tabla 16: caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Picramnia parvifolia* Engl.;** los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.

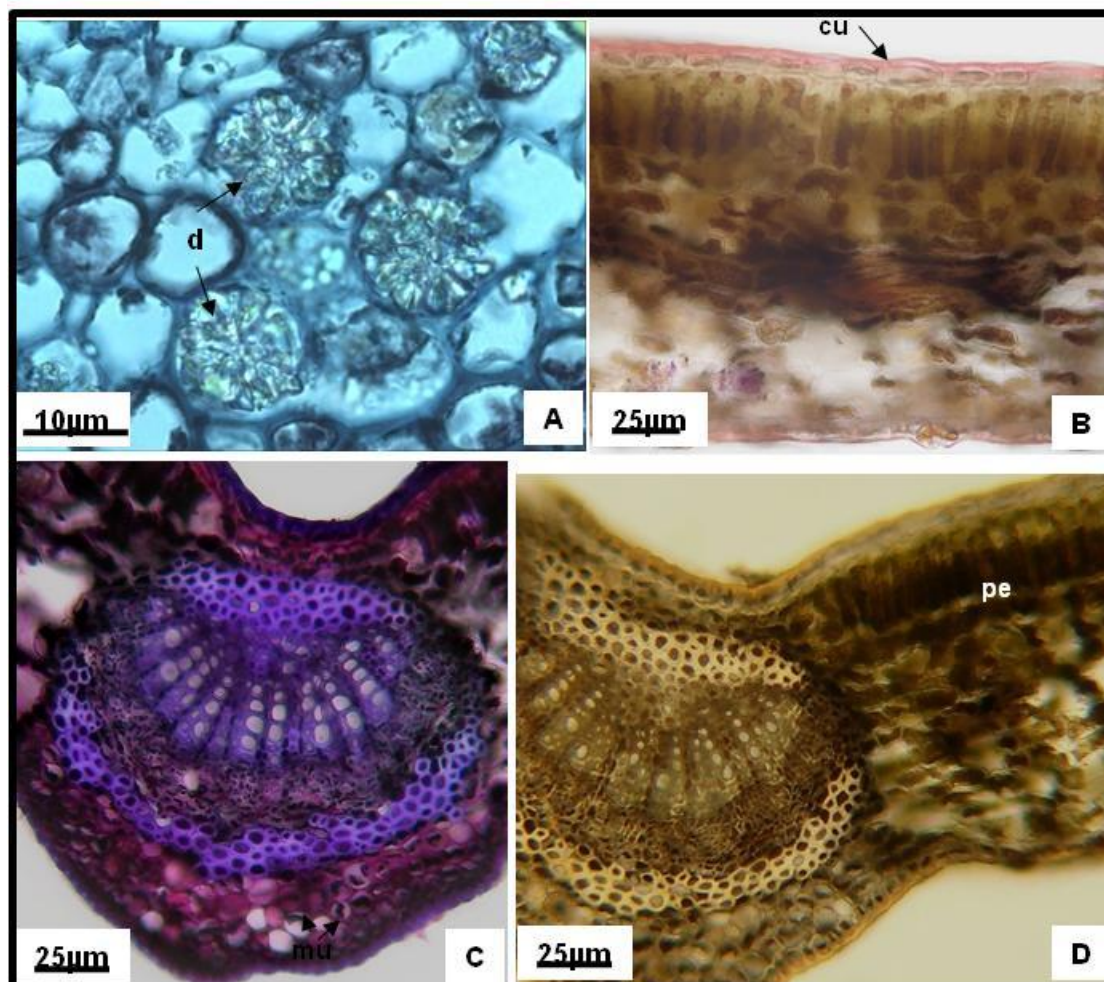
### **ANÁLISIS HISTOQUÍMICO**

---

La tinción de los cortes transversales de los folíolos con el reactivo de Sudán IV permitió la observación de una gruesa cutícula, constituida por cutina, sobre la epidermis adaxial, y una más delgada sobre la epidermis abaxial (Fig. 76B) de los mismos. Se detectaron idioblastos conteniendo mucílagos en el parénquima esponjoso de los folíolos al teñir los cortes transversales con violeta de cresilo (Fig. 76C) y taninos en el parénquima en empalizada cuando se trató las muestras con solución acuosa de cloruro férrico (Fig. 76D).

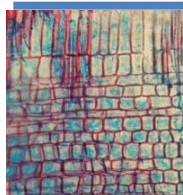
La observación de las secciones transversales de los folíolos bajo luz polarizada permitió la detección de drusas y cristales poliédricos en el parénquima esponjoso de los folíolos (Fig. 76A).





**Figura 76: Análisis histoquímico de *Picramnia parvifolia* Engl. A-D:** Hoja en sección transversal; **A:** Parénquima esponjoso, observación de cristales de oxalato de calcio con luz polarizada; **B:** Semilimbo, tinción con Sudán IV; **C:** Nervio medio, tinción con violeta de cresilo; **D:** Nervio medio, tinción con solución de FeCl<sub>3</sub> al 10%; **cu:** Cutícula; **d:** Drusas de oxalato de calcio; **mu:** Idioblastos mucilaginosos; **pe:** Parénquima en empalizada conteniendo taninos.





## *Picramnia sellowii* Planch.



***Picramnia sellowii* Planchon, *London J. Bot.* 5: 578. 1846.**

*Picramnia sellowii* fo. *Glabrescens* Chodat & Hassl. *Bull. Herb. Boissier*, sér.2, 3:800. 1903; *Picramnia sellowii* fo. *hirsuta*. Chodat & Hassl. *Bull. Herb. Boissier*, sér.2, 3:800. 1903; *Picramnia sellowii* fo. *Intermedia* Chodat y Hassl. *Bull. Herb. Boissier*, sér.2, 3:800. 1903; *Picramnia sellowii* var. *latifolia* Engl. *Fl. Bras.* 12(2):232. 1874; *Picramnia sellowii* subsp. *spruceana* (Engl.) Pirani. *Bol. Bot. Univ. Sao Paulo* 12: 132. 1990.

Arbustos a subarbustos de 1-4 m de altura. Corteza rugosa, cinérea o acastañada y con muchas lenticelas de color más claro. Hojas imparipinadas, inequiláteras, 10-18 cm long., con pecíolo de 1-2 cm, de 9-15 folíolos de 4-8 x 1-3 cm, alternos a sub-opuestos, membranáceos a cartáceos, oval-lanceolados, de ápice agudo con margen revuelto, pubérulo, cortamente peciolulado (Fig. 78A, B). Flores en racimos o panículas de racimos colgantes, con eje fulvo-tomentoso; brácteas lineal-lanceoladas de 1-2 mm, densamente pilosas. Flores sub-sésiles, amarillentas, 5-meras. Sépalos ovales, pilosos. Pétalos lineares. Estambres 5, filiformes. Disco 5-lobado. Estaminodios 5, menores o iguales a los pétalos, lineares. Ovario ovoide sub-glabro, 2 lóculos; estilo corto, estigmas 2, poco divergentes o erectos. Fruto: baya ovoide-oblonga, a veces globosa, rojiza, 1x 0,5-0,7 cm, ápice obtuso, apiculado, coronado por los 2 estigmas persistentes recurvados, con pedicelo piloso de 8-10 mm (Fig. 78A) (Xifreda y Seo, 2006).

**NOMBRES VULGARES:** “Cedrillo”, “Cedrillo-na” y “Tarirí”

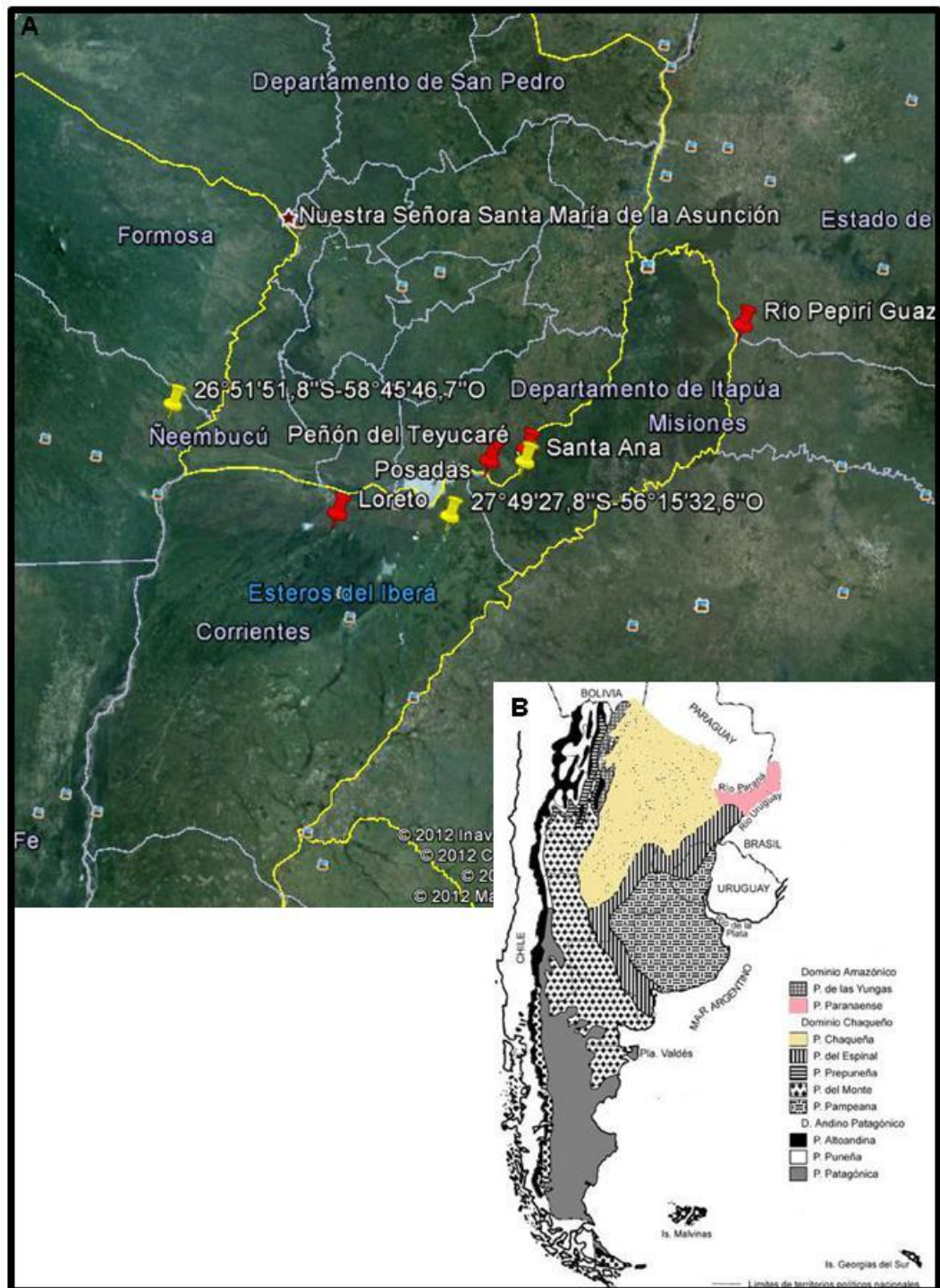
### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT**

Se encuentra en la provincia biogeográfica Chaqueña (Formosa, Chaco, este de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca y La Rioja, todo Santiago del Estero, norte de San Luis, Córdoba y Santa Fe, y noroeste de Corrientes) y en la provincia biogeográfica Paranaense (Misiones y el extremo nordeste de Corrientes, con selvas marginales que se extienden hacia el sur formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay) entre los 0- 500 m sobre el nivel del mar (Fig. 77). Se extiende a Bolivia, sur de Brasil, Uruguay y Paraguay (Xifreda y Seo, 2006).

El clima es cálido y húmedo en la provincia Paranaense a cálido y moderadamente seco en la P. Chaqueña, con precipitaciones que varían entre 500 y 1200 mm hasta 2012 mm anuales en la P. Paranaense (Cabrera, 1971).

### **USO VERNÁCULO.**

Se utiliza como alterante (Toursarkissian, 1980). En Paraguay las hojas son utilizadas como compresas para curar heridas (Pohle y Reinhardt, 2004).



**Figura 77: Distribución geográfica de *Picramnia sellowii* Planch.**  
**A:** ▲ Sitios de colección; ▲ Citas de herbarios y bibliográficas. **B:** Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *Picramnia sellowii*.

---

**CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

**HOJAS.**

Las hojas son compuestas, imparipinnadas y pecioladas, con 9-15 folíolos alternos a subopuestos, de 4-8 cm. de long. x 1-3 cm. lat., membranáceos a cartáceos, oval-lanceolados, margen poco revuelto, ápice obtuso, base asimétrica obtusa o raramente aguda (Fig. 78A y B; Fig. 80A y B).

**CORTEZA**

De color gris pardusco con estrías longitudinales y transversales poco profundas que delimitan pequeñas placas. Posee abundantes lenticelas con importante reborde (Fig. 78C). Fractura entera, sabor amargo y olor característico.

**LEÑO**

El leño es de color amarillo pardusco (Fig. 78D), no se diferencian albura y duramen. En sección transversal los poros no son visibles y los anillos de crecimiento son apenas perceptibles.





**Figura 78: Exomorfología de *Picramnia sellowii* Planch. A-B: Rama con infructescencia; C: Detalle de corteza; E: Detalle del leño**



## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS.

### HOJA

#### *Lámina del folíolo en vista superficial*

*Arquitectura Foliolar:* la venación es camptódroma, broquidódroma (Fig.79A; Fig. 80B, C). Poseen de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinnadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres (Fig. 79A; Fig. 80B, C). Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas y rectas o curvas. La red vascular es de densidad intermedia.

*Epidermis adaxial:* cutícula delgada y lisa. Células poligonales de paredes anticlinales ligeramente sinuosas y ligeramente más grandes que las de la epidermis abaxial, elongadas sobre los nervios. No se observan estomas. Presenta tricomas simples, unicelulares, de paredes delgadas, que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras, y glandulares con pie uniseriado de longitud variable y cabeza pluricelular (Fig. 80D, F).

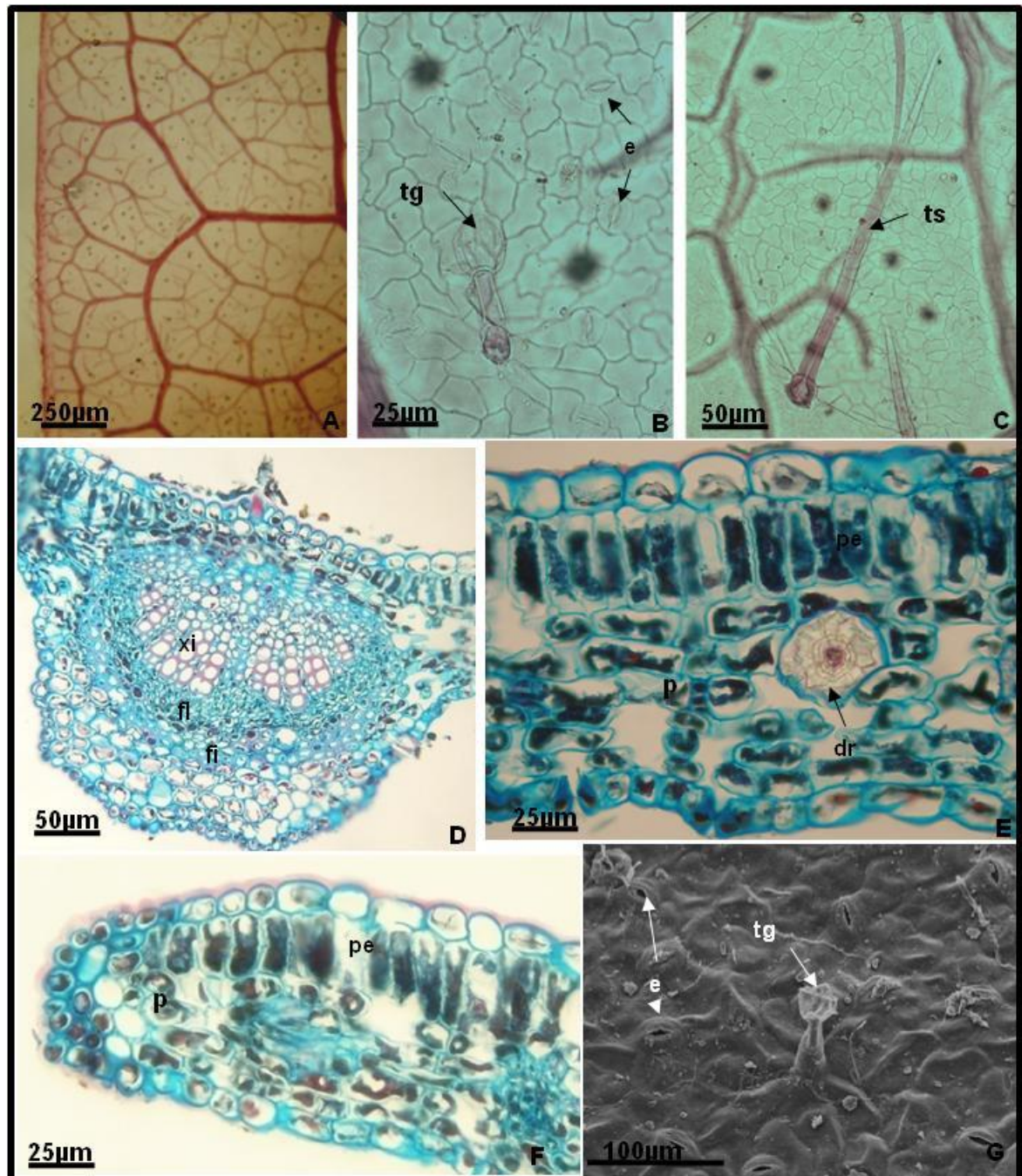
*Epidermis abaxial:* cutícula delgada y lisa. Células poligonales de paredes anticlinales levemente sinuosas y elongadas sobre el nervio medio, con estomas del tipo anomocíticos al mismo nivel que las restantes células epidérmicas. Se observan tricomas simples y glandulares similares a los de la epidermis adaxial (Fig. 79B, C, G; Fig. 80E).

#### *Lámina del folíolo en corte transversal.*

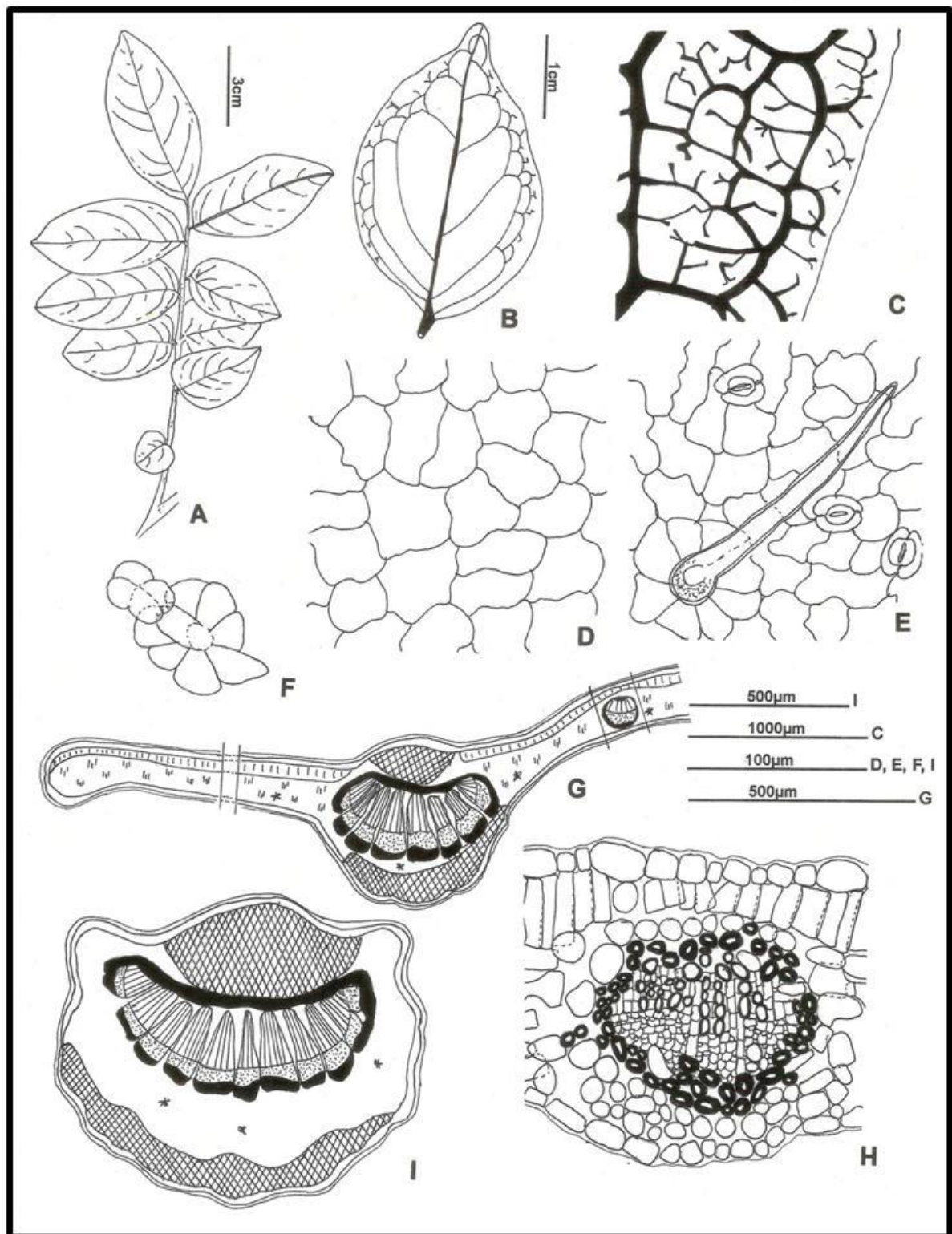
*Epidermis adaxial:* uniestratificada (Fig. 79E).

La hoja es hipoestomática. El mesofilo es de estructura dorsiventral, con 1-2 hileras de parénquima en empalizada (Fig. 79E, F; Fig. 80G, H). Se observan abundantes drusas de oxalato de calcio en el parénquima (Fig. 83B). En posición subepidérmica la vena media se halla reforzada por colénquima de tipo laminar del lado adaxial y abaxial. El nervio medio está constituido por 5 a 7 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos en forma de arco, acompañados por una vaina conspicua de fibras (Fig.79D; Fig.80G). Los haces de nervios menores se hallan rodeados de una vaina parenquimática (Fig. 80H).

*Epidermis abaxial:* uniestratificada.



**Figura 79: Fotomicrografía de hoja de *Picramnia sellowii* Planch.** A-C: Vista superficial; A: Arquitectura foliolar; B y C: Epidermis abaxial; D-F: Sección transversal; D: Nervio medio; E: Semilimbo; F: Borde del semilimbo; G: MEB, epidermis abaxial. dr: Drusas; e: Estomas; fi: Fibras; fl: Floema; p: Parénquima esponjoso; pe: Parénquima en empalizada; tg: Tricoma glandular; ts: Tricoma simple; xi: Xilema.



**Figura 80: Micrografía de hoja de *Picramnia sellowii* Planch.** A: Morfología foliar; B-C: Arquitectura foliar; B: Aspecto general; C: Venación del borde y areolas; D-F: Epidermis en vista superficial; D: adaxial; E: abaxial; F: Tricoma glandular; G-I: Sección transversal; G: Nervio medio; H: Detalle de lo indicado en G; I: Pecíolo.



### **PECIOLULO.**

En sección transversal es de contorno plano convexo. La epidermis es uniestratificada, con cutícula delgada y tricomas unicelulares, similares a los descritos para las hojas. En posición subepidérmica se localizan 2-4 hileras de colénquima laminar. El parénquima fundamental contiene numerosos idioblastos con drusas de oxalato de calcio. El sistema vascular del nervio medio adopta forma de arco abierto reforzado con una vaina de fibras blandas (Fig. 80I).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico para las hojas se expresan en la Tabla 17.

### **CORTEZA**

#### *Corteza externa*

Ritidoma constituido por una peridermis exfoliante formada por 15-30 hileras de células de súber de dimensiones variables (Fig. 81A, B). Las células del súber en sección transversal son rectangulares, con paredes de engrosamiento mediano y heterogéneo y, las basales con engrosamiento en forma de “U” o lignificadas (Fig. 81C). En vista superficial son de forma poligonal. La felodermis es pluriestratificada. Se observa floema funcional y parénquima escaso con células que contienen drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio, y esclereidas aisladas.

#### *Corteza interna*

En el límite con el floema funcional se observan grupos heterogéneos, de diferentes dimensiones, de fibras, macroesclereidas, braquiesclereidas y fibroesclereidas, algunas incluyen cristales poliédricos de oxalato de calcio (Fig. 81A, D). Las fibras floemáticas son de paredes medianamente engrosadas y generalmente septadas. Las macroesclereidas y braquiesclereidas poseen paredes engrosadas, algunas con cristales poliédricos de oxalato de calcio incluidos (Fig. 81E-H).

El floema funcionales atravesado por radios 1-3-seriados que se ensanchan en la región distal, algunas células de los radios se esclerosan (Fig. 81A).

El parénquima axial contiene aislados cristales poliédricos de oxalato de calcio de diferentes tamaños.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 17.



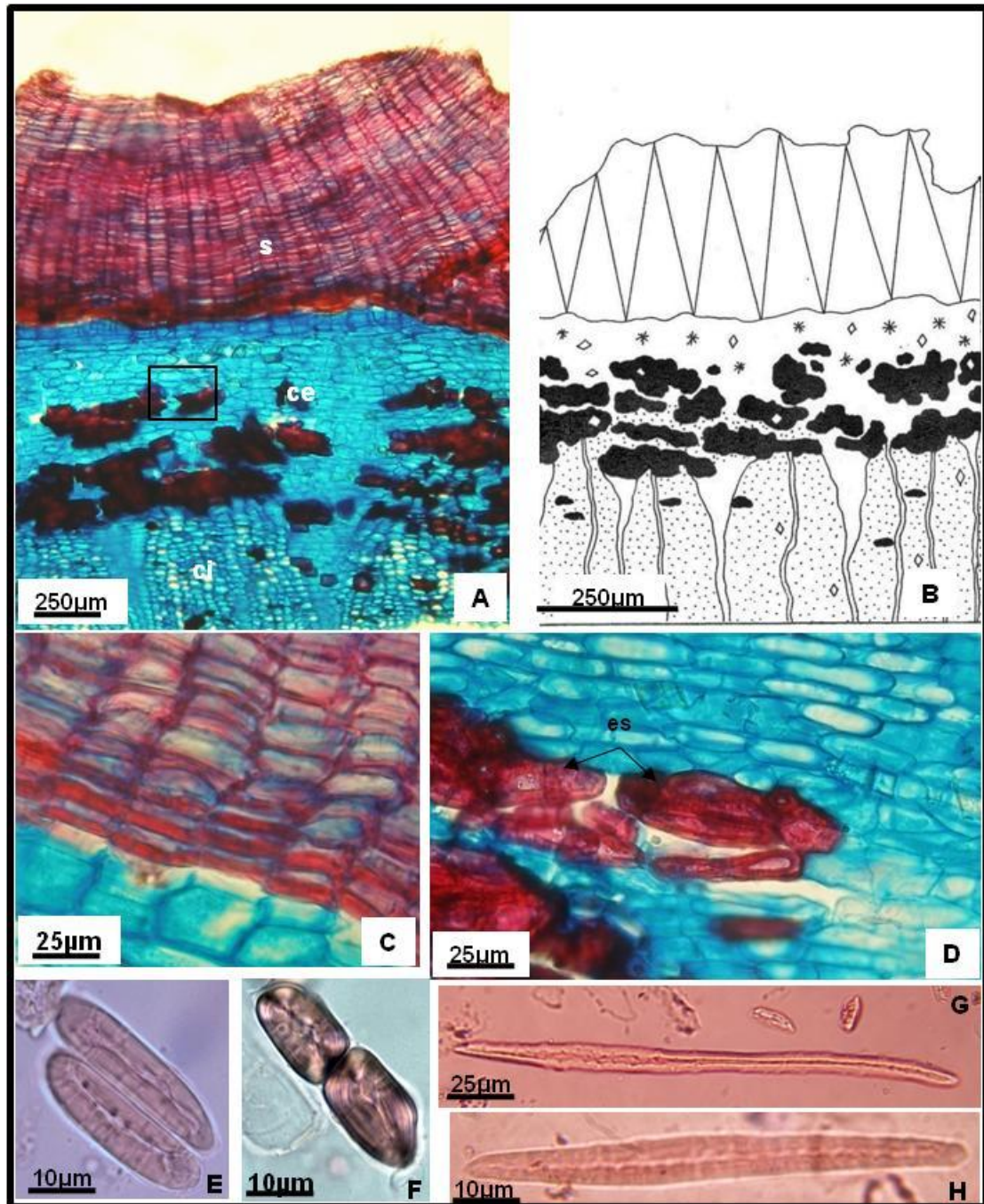
### LEÑO

La porosidad es difusa no uniforme. El crecimiento es semi-anular (Fig. 82A, H). Los vasos son de contorno circular, algunos elípticos, con placa de perforación simple y puntuaciones intervasculares areoladas alternas (Fig. 82D-G). Se disponen con distribución radial, la mayoría son múltiples de 4 a 10 elementos y escasos solitarios.

Parénquima axial casi nulo o apenas metatraqueal, con dos células por banda de parénquima. El sistema radial es heterogéneo, está compuesto por radios uniseriados y 2 o 3 seriados, no estratificados. Los radios uniseriados son homocelulares de células erectas cuadrangulares y los 2-3 seriados heterocelulares con 1 a 5 células procumbentes en el cuerpo del radio y 2 a 4 o más de 4, células erectas en los márgenes de los mismos (Fig. 82B, C). Las células poseen paredes medianamente engrosadas, puntuaciones simples y no dejan espacios intercelulares entre sí.

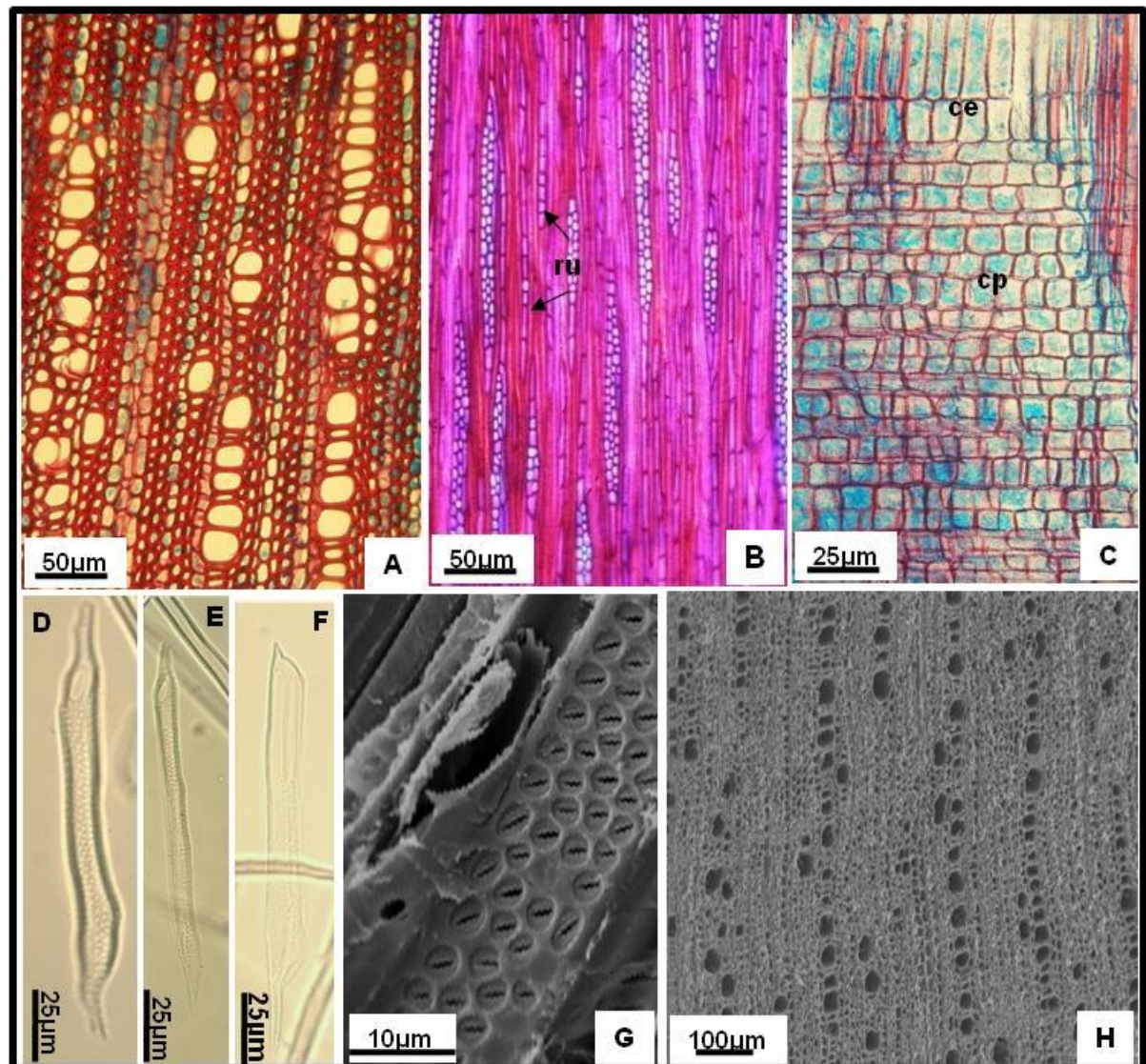
Las traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas son de paredes medianamente engrosadas. Fibras xilares septadas y no, con puntuaciones simples y paredes medianamente engrosadas.

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 17.



**Figura 81: Fotomicrografía de corteza de *Picramnia sellowii* Planch. A-D:** Sección transversal; **A:** Vista panorámica; **B:** Representación esquemática; **C:** Corteza externa, súber; **D:** Detalle de lo indicado en **A**; **E- H:** Material macerado; **E:** Macroesclereidas; **F:** Braquiesclereidas; **G:** Fibroesclereida; **H:** Macroesclereida. **ce:** Corteza externa; **ci:** Corteza interna; **es:** Esclerénquima; **s:** Súber.





**Figura 82: Fotomicrografía del leño de *Picramnia sellowii* Planch.** **A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal tangencial; **C:** Sección longitudinal radial; **D-F:** Material macerado, miembros del vaso; **G-H:** MEB; **G:** Sección longitudinal, puntuaciones intervasculares areoladas alternas. **H:** Sección transversal; **ce:** Células erectas; **cp:** Células procumbentes; **ru:** Radios uniseriados

Hoja	Índice de estomas	11,0 ± 1,3	
	Estomas x mm <sup>2</sup>	261,1 ± 63,4	
	Índice de empalizada	4,0 ± 0,6	
	Tricomassimples x mm <sup>2</sup>	105 ± 20	
	Longitud de tricomas simples (µm)	543,4± 57,6 a 203,2± 21,7	
Corteza	Latitud células de súber en transcorte	10,9±2,8	
	Longitud células de súber en transcorte	30,3±5,3	
	Diámetro células de. súber	27,4±4,9	
	Diámetro braquiesclereidas	28±6 (22-40)	
	Long. Macroesclereidas	101,4±31,1 (62-146)	
	Long. Fibroesclereidas	302±50 (240-400)	
	Long. Fibras no septadas (57%)	822,0 ± 127,7 (640-1040)	
	Long. Fibras septadas (43%)	849,8 ± 119,7 (640-1040)	
Leño	Longitud elementos del vaso	506,4±54,0 (432-616)	
	Diámetro elementos del vaso	57,7 ± 14,7 (30-84)	
	Longitud fibras no septadas (57%)	822,0 ± 127,7 (640-1040)	
	Long. Fibras septadas (43%)	849,8 ± 119,7 (640-1040)	
	Latitud de fibras	24,8±4,5	
	Vaso x mm <sup>2</sup>	41,8 ± 7,5	
	Altura de los radios	Unicelulares	12±3
		Pluricelulares	29±7
	Índice de vulnerabilidad	1,4	
	Índice de mesomorfía	699	

**Tabla 17: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Picramnia sellowii* Planch.;** los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.

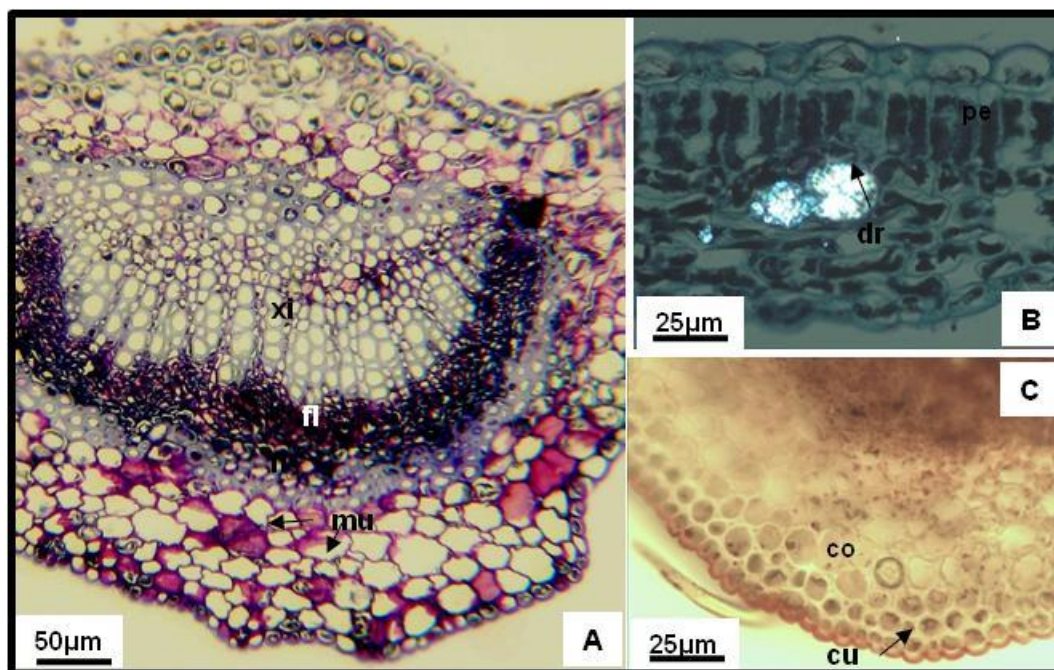


---

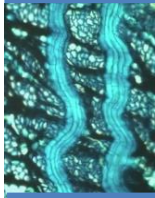
**ANÁLISIS HISTOQUÍMICO.**

---

Se constató la presencia de mucílagos en el parénquima esponjoso de los folíolos, al teñir los cortes con violeta de cresilo (Fig. 83A). La sección transversal de los folíolos al ser tratados con reactivo de Sudán IV, mostró la cutícula de ambas epidermis coloreada de rojo/rosado, por lo que se infiere su naturaleza lipídica (cutina), (Fig. 83C). La observación de los cortes de hoja y corteza bajo luz polarizada permitió detectar drusas de oxalato de calcio en el mesófilo de los folíolos y en el parénquima cortical y parénquima de radio de la corteza (Fig. 83B).



**Figura 83: Análisis histoquímico de *Picramnia sellowii* Planch. A-C:** Hoja en sección transversal; **A:** Nervio medio, tinción con violeta de cresilo; **B:** Semilimbo, observación con luz polarizada; **C:** Nervio medio, tinción con Sudán IV. **co:** Colénquima; **cu:** Cutícula; **dr:** Drusas; **fl:** Floema; **mu:** Mucilagos; **pe:** Parénquima en empalizada; **xi:** Xilema.



## *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.



***Picrasma crenata* (Vell.) Engl., Engl. u. Prantl, *Nat. Pflanzenfam.* 3 (4): 222. 1896.** *Aescherion crenata* Vell., *Fl. flum.* 1:58. 1829; *Icon. Tab.* 152. 1831; *Picrasma vellozii* Planch., Planch., *London J. Bot.* 5: 574. 1846, *Picraena vellozii* (Planch.) Engl., en Martius, *Fl. Bras.* 12 (2): 227. 1874; *Picrasma palo-amargo* Speg., *Physis* 3:173. 1917; *Picraena palo-amargo* (Speg.) Speg., *Physis* 7:93. 1923; *Picramnia crenata* (Vell.) Hassl., *Ind. Dendr. Arg.* 1:59. 1935.

Árboles a subarbustos de 2 a 6 m de altura de corteza castaña, rugosa, con abundantes lenticelas. Hojas con pecíolos de 2-9 cm, con 9-19 folíolos, de 4-10 cm, con peciolulos de 1-5 mm, opuestos, alternos, membranáceos, oval-elípticos con el margen ligeramente crenado o aserrado (Fig. 85A, B). Inflorescencias axilares, corimbosas, de 7-12 cm, eje longitudinalmente estriado y esparcidamente pubescente. Flores verduscas, con 4-5 sépalos libres, oblongos, de 1 mm de longitud, 4-5 pétalos oblongos con un ápice agudo de 3-4 mm de longitud. Flores estaminadas con 4-5 estambres alternipétalos, con filamentos subulados, insertos en la base de un ginóforo 4-5 lobulado, con 4-5 pistilodios rudimentarios. Flores pistiladas con 4-5 estaminodios cortos; carpelos 2-5 sobre un ginóforo anular, unidos por los estilos, con estigmas libres y divergentes, con un óvulo basal en cada carpelo. Drupa con 1-2 (3) carpelios situados en el ginóforo desarrollado, engrosado y ennegrecido, carpelios ovoides, acastañados y rugosos cuando secos (Pirani, 1987; Xifreda y Seo, 2006).

**NOMBRES VULGARES:** “Palo amargo” o “Quina brava”.

En Brasil se la conoce como “Quassia de Brasil” o “Quassia amarga”

### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.**

Se encuentra en la Provincia Biogeográfica Paranaense Misiones y el extremo nordeste de Corrientes, con selvas marginales que se extienden hacia el sur formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay), entre los 0 y 500m sobre el nivel del mar (Fig. 84). Se extiende por América tropical, en Bolivia, Brasil y Paraguay (Xifreda y Seo, 2006).

El clima es cálido y húmedo, con precipitaciones durante todo el año, que varían entre los 1500 y 2012 mm anuales. La temperatura media anual varía entre los 20° y 21°C, siendo los inviernos suaves y los veranos no excesivamente cálidos debido a las frecuentes lluvias (Cabrera, 1971).

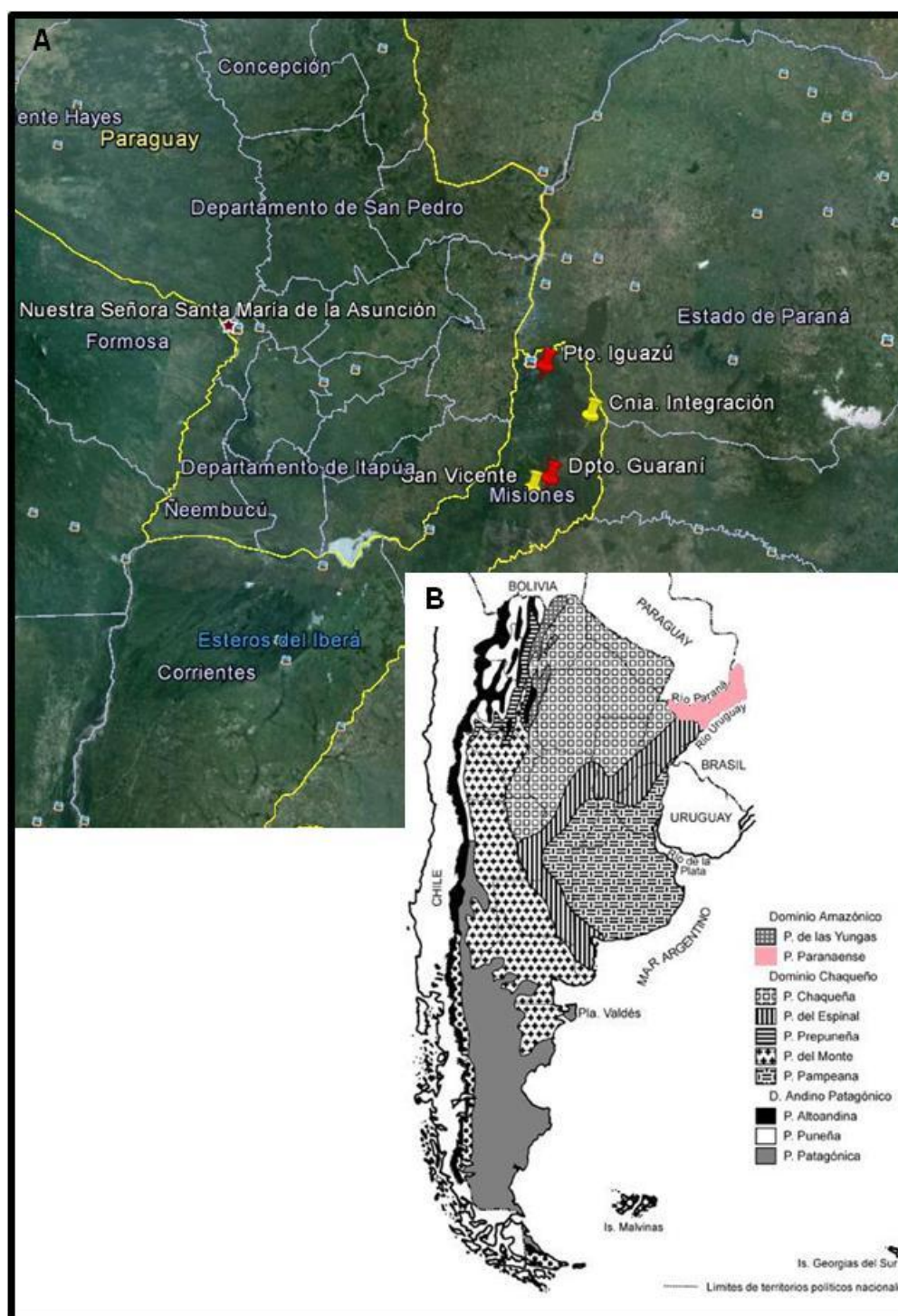
#### *USO VERNÁCULO.*

El leño se utiliza como antiperiódico, tónico, antisifilítico e insecticida (Toursarkissian, 1980).

En Argentina, el leño es utilizado contra trastornos gastrointestinales y para el control de la pediculosis. (Rodríguez y col., 2008). El tallo es utilizado como amargo en la preparación de bebidas alcohólicas y aperitivos, como insecticida y en tinturas, como sustituto de *Quassia amara* y/o *Picrasma excelsa*, para el tratamiento de la pediculosis (Roldan y col., 2007).

En Brasil es utilizada para tratar la Diabetes mellitus, perturbaciones gástricas e hipertensión (Oliveira y col., 2005)





**Figura 84: Distribución geográfica de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.**  
**A:** ▲ Sitios de colección; ▲ Citas de herbarios y bibliográficas. **B:** Provincias Biogeográficas Argentinas donde habita *Picrasma crenata*.

---

## **CARACTERES EXOMORFOLÓGICOS.**

---

### **HOJAS**

Hojas con pecíolo de 2 a 9 cm, con 9 a 19 folíolos, de 4 a 10 cm, opuestos, alternos, membranáceos, oval-elíptico con el margen ligeramente crenado o aserrado (Fig. 85A, B; Fig. 87A, B).

### **CORTEZA**

La superficie externa de la corteza de ramas jóvenes es de color pardo grisáceo con finas estrías longitudinales. En ramas laterales, con crecimiento secundario y añosas, el ritidoma se halla muy desarrollado, poco desprendible, lo que origina una superficie irregular formada por placas rectangulares de tamaños diversos, de color castaño oscuro y escaso depósito de líquenes (Fig. 85C). La superficie interna es de color pardo amarillento, con leves estrías longitudinales. Presenta fractura fibrosa, es inodora y de sabor amargo.

### **LEÑO**

En sección transversal el leño es de color blanco amarillento o amarillo, con anillos de crecimiento visibles a la lupa, delimitados por la formación de bandas tangenciales más claras, correspondientes al parénquima xilemático y frecuentemente mencionados como “falsos” anillos anuales (Fig. 85D). La porosidad es anular en tallos añosos y difusa con tendencia semicircular en tallos jóvenes. No se observa diferencia entre duramen y albura; el tejido medular es escaso.



**Figura 85: Exomorfología de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. A: Hojas; B: detalle de la hoja; C: Detalle de la corteza; D: Leño.**

## CARACTERES ENDOMORFOLÓGICOS

### HOJAS

#### *Lámina en vista superficial.*

Arquitectura foliolar: la venación es camptódroma, broquidódroma. Posee de 4 a 5 órdenes de venas, las secundarias son pinadas, mientras que las de orden superior son reticuladas. Las venas marginales forman ojales cerrados con terminaciones vasculares libres. Las areolas son poligonales dispuestas al azar, coexistiendo terminaciones vasculares simples y ramificadas, rectas y curvas. La red vascular es de densidad intermedia (Fig. 86A; Fig. 87B, C)

*Epidermis adaxial:* células poligonales de paredes anticlinales de contorno levemente sinuoso. No se observan estomas. Presenta escasos tricomas simples unicelulares que se ubican con mayor densidad sobre las nervaduras y bordes de la lámina (Fig. 86H; Fig. 87D, F).

*Epidermis abaxial:* cutícula delgada levemente estriada. Células de contorno más sinuoso y menor tamaño que las de la epidermis adaxial. Se observan estomas del tipo anomocito al mismo nivel que las restantes células epidérmicas, y tricomas simples con características similares a los de la epidermis adaxial (Fig. 86B, C, G, I; Fig. 87E).

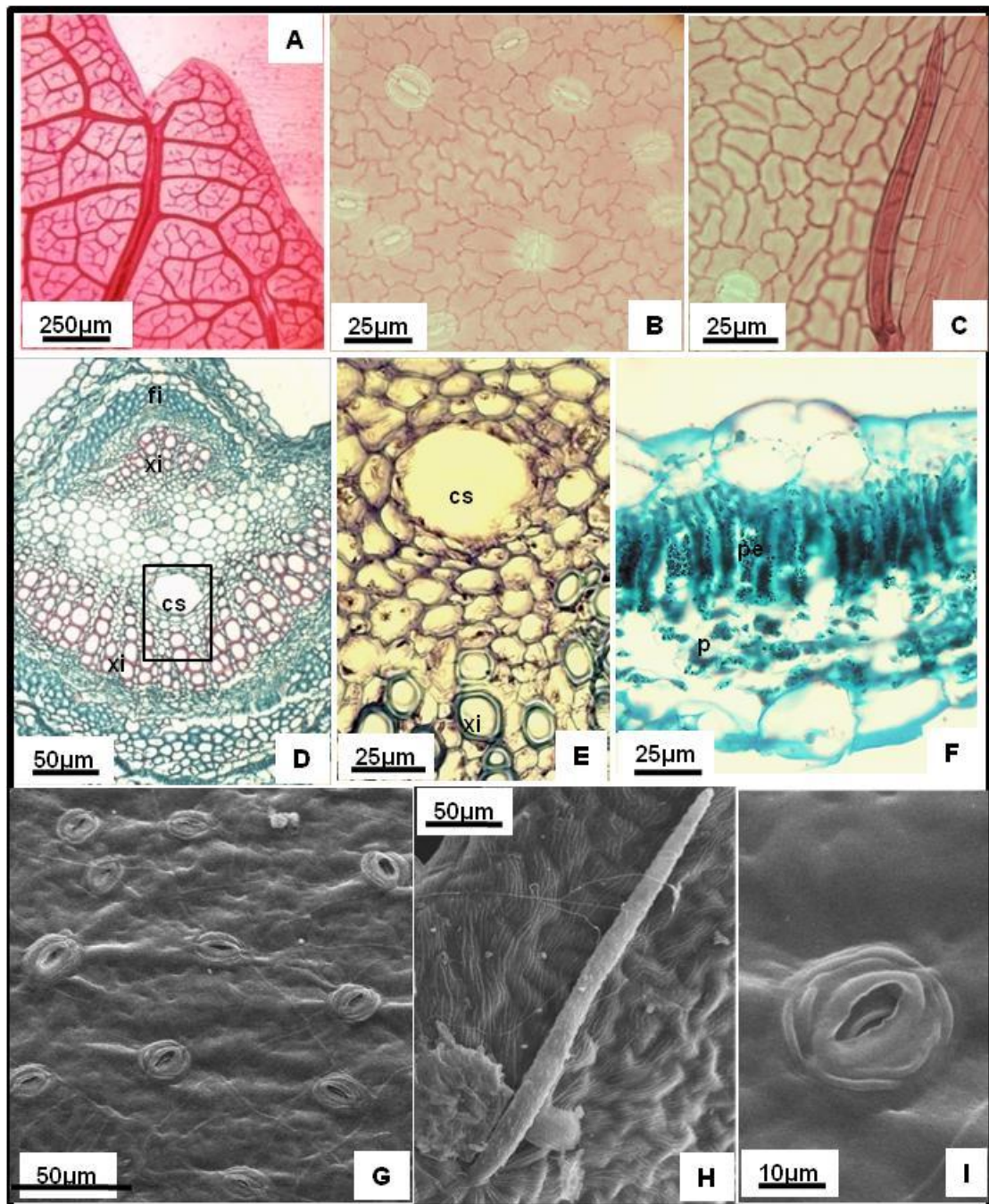
#### *Lámina en corte transversal.*

*Epidermis adaxial:* uniestratificada, de células rectangulares, por sectores se observa una segunda capa de células de mayor tamaño, constituyendo una epidermis biestratificada discontinua (Fig. 86F).

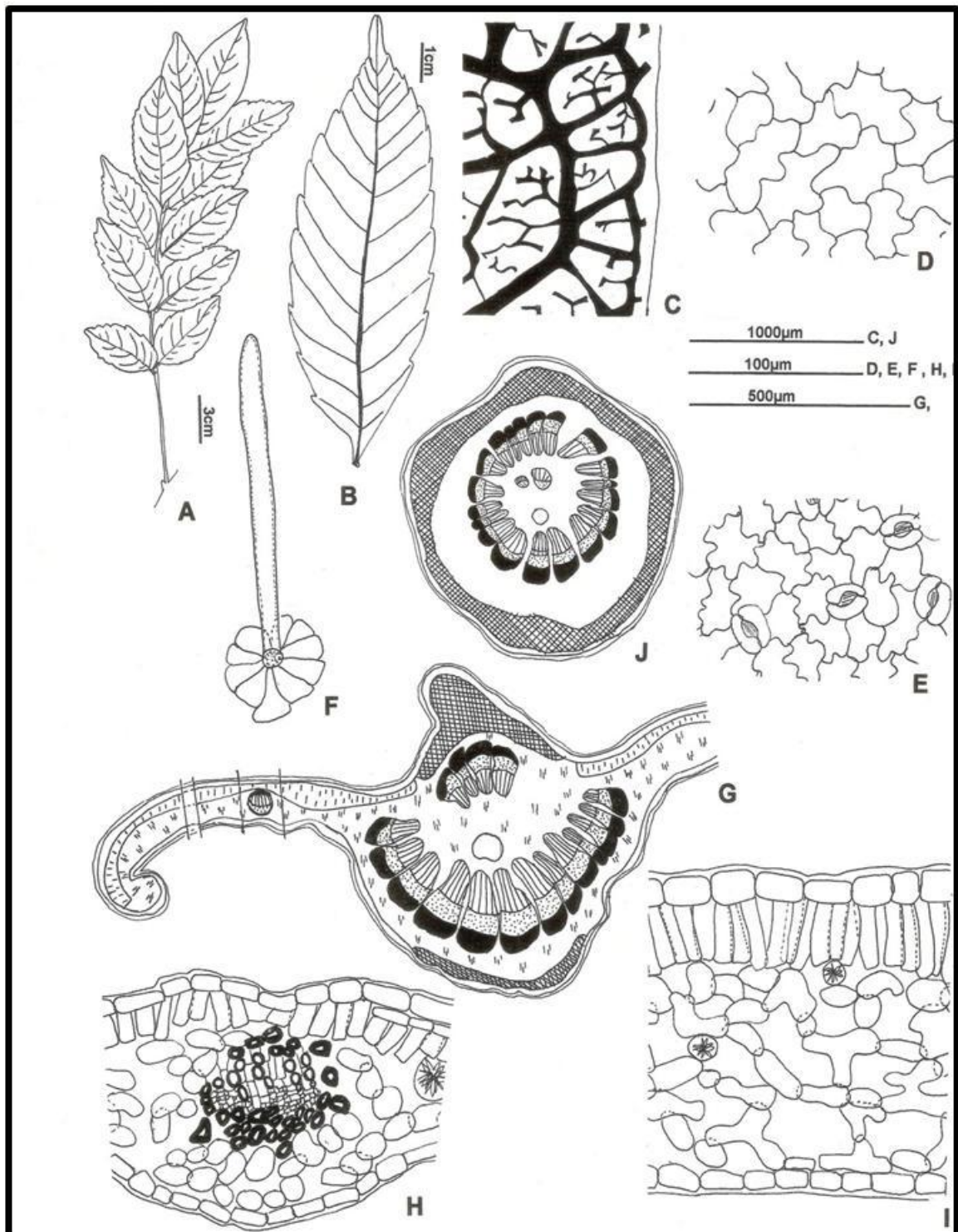
La hoja es hipoestomática. El mesófilo es de estructura dorsiventral, con una hilera de parénquima en empalizada de células cortas. El parénquima esponjoso posee células laxamente dispuestas originando amplios espacios intercelulares (Fig. 86F; Fig. 87G, I). Se observan a través de todo el mesófilo numerosos Idioblastos cristalíferos conteniendo drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio. En posición subepidérmica la vena media se halla reforzada por colénquima laminar. El nervio medio está constituido por 14-15 haces vasculares colaterales abiertos dispuestos circularmente y rodeados por una prominente vaina de fibras (Fig. 86D; Fig. 87G). En la región parenquimática central se observa una cavidad secretora esquizolisígena y drusas de oxalato de calcio en el parénquima floemático (Fig. 86D, E).

*Epidermis adaxial:* uniestratificada y biestratificada por secciones.





**Figura 86: Fotomicrografía de hoja de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. A-C:** Vista superficial; **A:** Arquitectura foliolar; **B** y **C:** Epidermis abaxial; **D-F:** Sección transversal; **D:** Nervio medio; **E:** Detalle de la zona marcada en **D**; **F:** Semilimbo; **G-I:** MEB; **G:** Epidermis abaxial; **H:** Epidermis adaxial con cutícula ornamentada; **I:** Detalle de un estoma y cutícula ornamentada. **cs:** Cavity secretor esquizolisígena; **epi:** Epidermis; **f:** Fibras; **p:** Parénquima esponjoso; **pe:** Parénquima en empalizada; **xi:** Xilema



**Figura 87: Micrografía de hoja de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.** A: Morfología foliar; B-C: Arquitectura foliolar; B: Aspecto general; C: Venación del borde y areolas; D-F: Epidermis en vista superficial; D: adaxial; E: abaxial; F: Tricoma simple; G-J: Sección transversal; G: Nervio medio; H: Detalle de lo indicado en G; I: Detalle del semilimbo; J: Pecíolo.

### **PECÍOLOLO.**

En sección transversal es de contorno circular. La epidermis es uniestratificada con cutícula delgada. En posición subepidérmica se observan 2 a 4 hileras de colénquima laminar. El nervio medio está constituido por numerosos haces vasculares abiertos dispuestos en círculo y rodeados por una vaina de fibras. En el parénquima medular existe una cavidad secretora esquizolisígena y numerosos cristales de oxalato de calcio (Fig. 87J).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico para las hojas se expresan en la Tabla 18.

### **CORTEZA**

#### *Corteza externa*

El ritidoma se halla constituido por 5 a 7 peridermis de disposición escamosa o imbricada, cada una formada por 15 a 40 hileras de células suberosas (Fig. 88A y B). Las células del súber en sección transversal son cuadrangulares a rectangulares con paredes homogéneas, poco engrosadas. En vista superficial son poligonales. La felodermis es pluriestratificada. Entre las distintas peridermis se observa floema no funcional.

#### *Corteza interna*

El floema funcional se halla interrumpido por numerosos radios 1 a 7 seriados, muy sinuosos y torsionados (Fig. 88A, D). El parénquima radial está constituido por células de distintos tamaños, con paredes sin engrosamiento que dejan espacios intercelulares y poseen gran cantidad de cristales poliédricos de oxalato de calcio (Fig. 88F; Fig. 90D). El parénquima axial, contiene drusas de oxalato de calcio dispuestas en series de parénquima septado.

Las fibras floemáticas son escasas, sin orientación determinada o apenas estratificadas (Fig. 88C).

Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares de la corteza se expresan en la Tabla 18.

### **LEÑO**

La porosidad es anular difusa, no uniforme. El crecimiento es semi-anular a anular (Fig. 89 A). Los vasos son de contorno circular con placa de perforación simple, apenas inclinada, con apéndices inconspicuos y puntuaciones intervasculares areoladas alternas con apertura de la puntuación inclusiva (Fig. 89E-H, K). En el leño temprano los vasos, se disponen con distribución radial en su mayoría, solitarios, geminados, racemiformes y múltiples cortos de 2 a 6 y escasos con distribución oblicua. En el leño tardío predominan los vasos solitarios o geminados de menor diámetro (fig. 89I, J). Se observan aisladas cavidades secretoras (Fig. 89D).

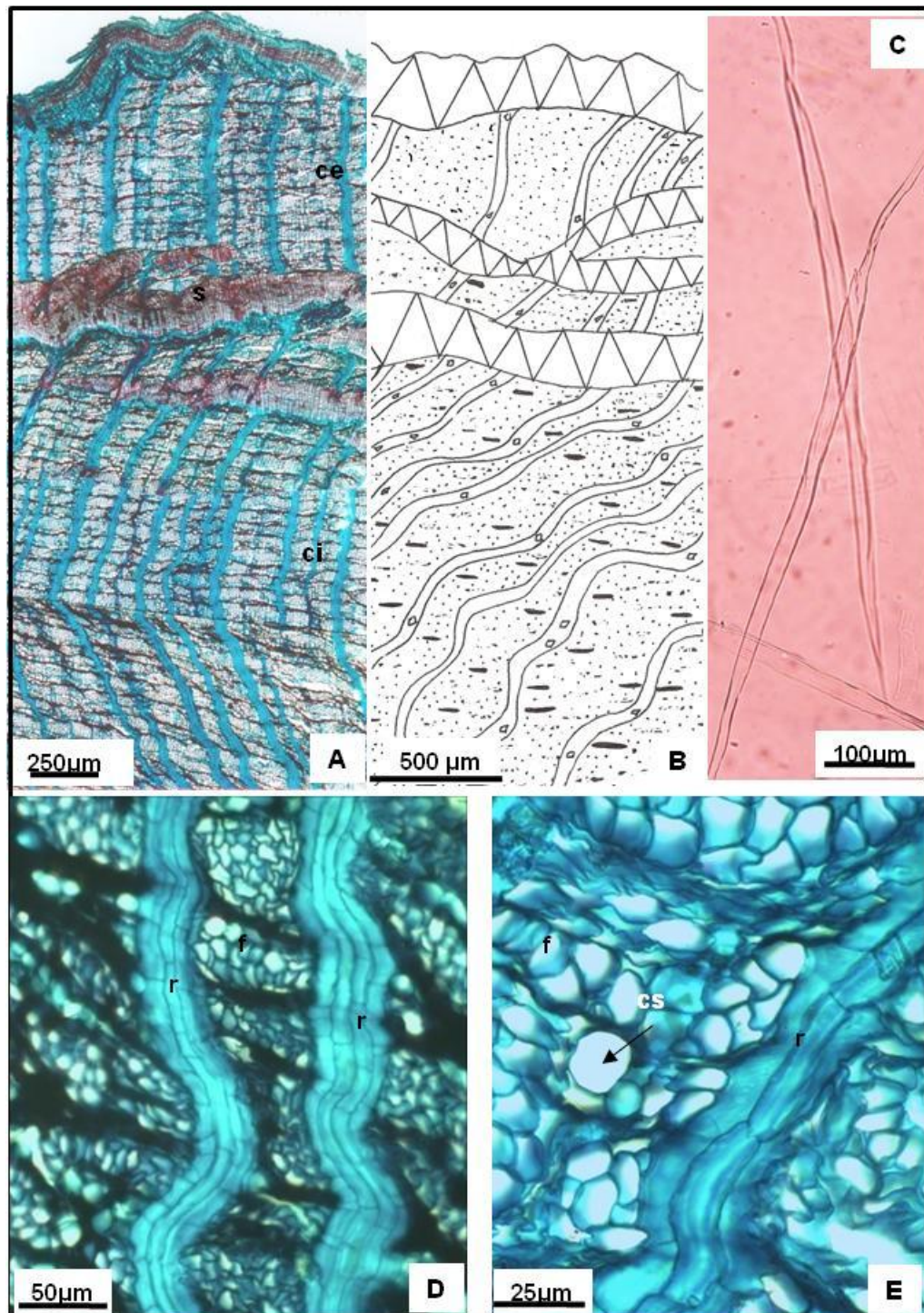
Las fibras xilares, traqueidas vasicéntricas y fibrotraqueidas interradales presentan paredes laterales, medianamente engrosadas. Las fibras xilares del tejido mecánico son fusiformes, con puntuaciones simples y de disposición no estratificada.

El parénquima axial, se observa en sección transversal como metatraqueal originando bandas tangenciales estratificadas interrumpidas, con 2 a 4 células por banda de parénquima; o bien, como paratraqueal confluyente, formado por células subrectangulares de paredes de grosor mediano. Contienen cristales poliédricos de oxalato de calcio.

El sistema radial es heterogéneo, está compuesto por radios 1 a 5 seriados, con células que contienen abundantes cristales de oxalato de calcio de morfología diversa, siendo más abundantes en células procumbentes (Fig. 89B, C; Fig. 89E).

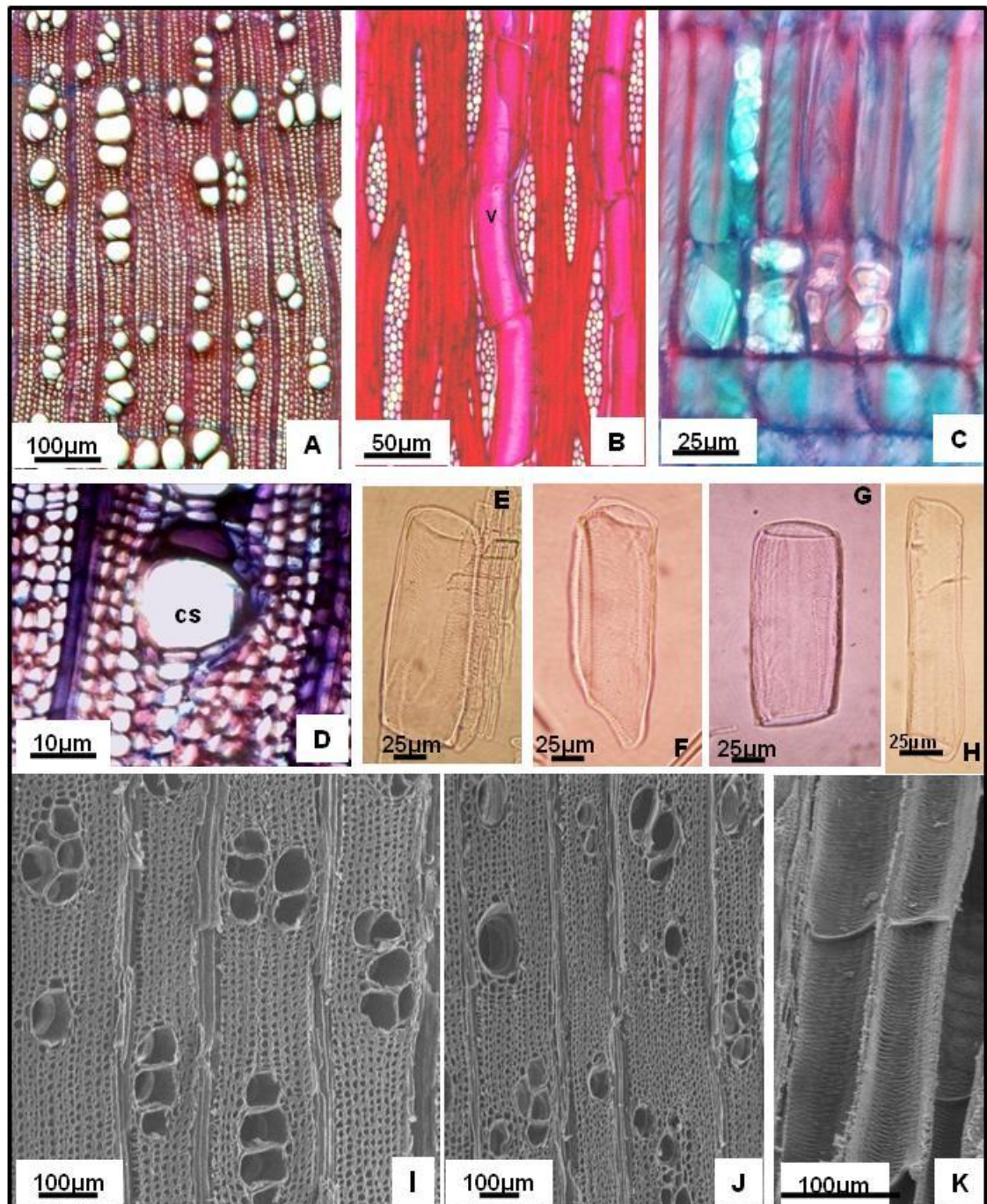
Los caracteres cuantitativos de valor diagnóstico de los elementos celulares del leño se expresan en la Tabla 18.





**Figura 88: Fotomicrografía de la corteza de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. A-D: Sección transversal; A: Vista panorámica; B: Representación esquemática; C: Material macerado, fibras; D y E: Corteza interna ; ce: Corteza externa; ci: Corteza interna; cs: Cavity secreta , f: Floema; r: Radio; s: Súber.**





**Figura 89: Fotomicrografía del leño de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. A:** Sección transversal; **B:** Sección longitudinal tangencial; **C:** Sección longitudinal radial; **D:** Sección transversal, cavidad secretora esquizolisígena; **E-H:** Material macerado, miembros del vaso; **I-K:** MEB; **I-J:** Sección transversal; **K:** Sección longitudinal, vasos. **cs:** Cavidad secretora esquizolisígena; **v:** Vaso.

Hoja	Índice de estomas		13.2 ± 2.3
	Estomas x mm <sup>2</sup>		270,7 ± 37,5
	Índice de empalizada		6,4 ± 0.8
	Tricomassimples x mm <sup>2</sup>		47,8 ± 5,9
	Longitud de tricomas simples (µm)		250,8 ± 59,6
Corteza	Latitud células de súber en transcorte		15,6±5,3
	Longitud células de súber en transcorte		34,6±7,8
	Diámetro células de. súber		32±8
	Diámetro braquiesclereidas		No posee
	Long. Macroesclereidas		No posee
	Long. Fibroesclereidas		No posee
	Long. Fibras no septadas	Cortas (48%)	853,0 ± 56,3 (800-980)
		Largas (52%)	1123,0 ± 94,8 (1000-1280)
Leño	Longitud elementos del vaso		280,4±17,1 (248-304)
	Diámetro elementos del vaso	Primavera	92,3 ± 18,7 (60-144)
		Verano	31,8 ± 7,4 (18-42)
	Longitud fibras no septadas		894,3 ± 80,2 (728-1040)
	Latitud de fibras		18,5±3,6
	Vaso x mm <sup>2</sup>		35,1 ± 10,3
	Altura de los radios	Unicelulares	7±2
		Pluricelulares	20±7
	Índice de vulnerabilidad		2,6
	Índice de mesomorfía		737

**Tabla 18: Caracteres cuantitativos de hoja, corteza y leño de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.;** los resultados se expresan como: porcentaje presente en la muestra, valor promedio y su correspondiente desvío estándar, y valores mínimos y máximos obtenidos.

---

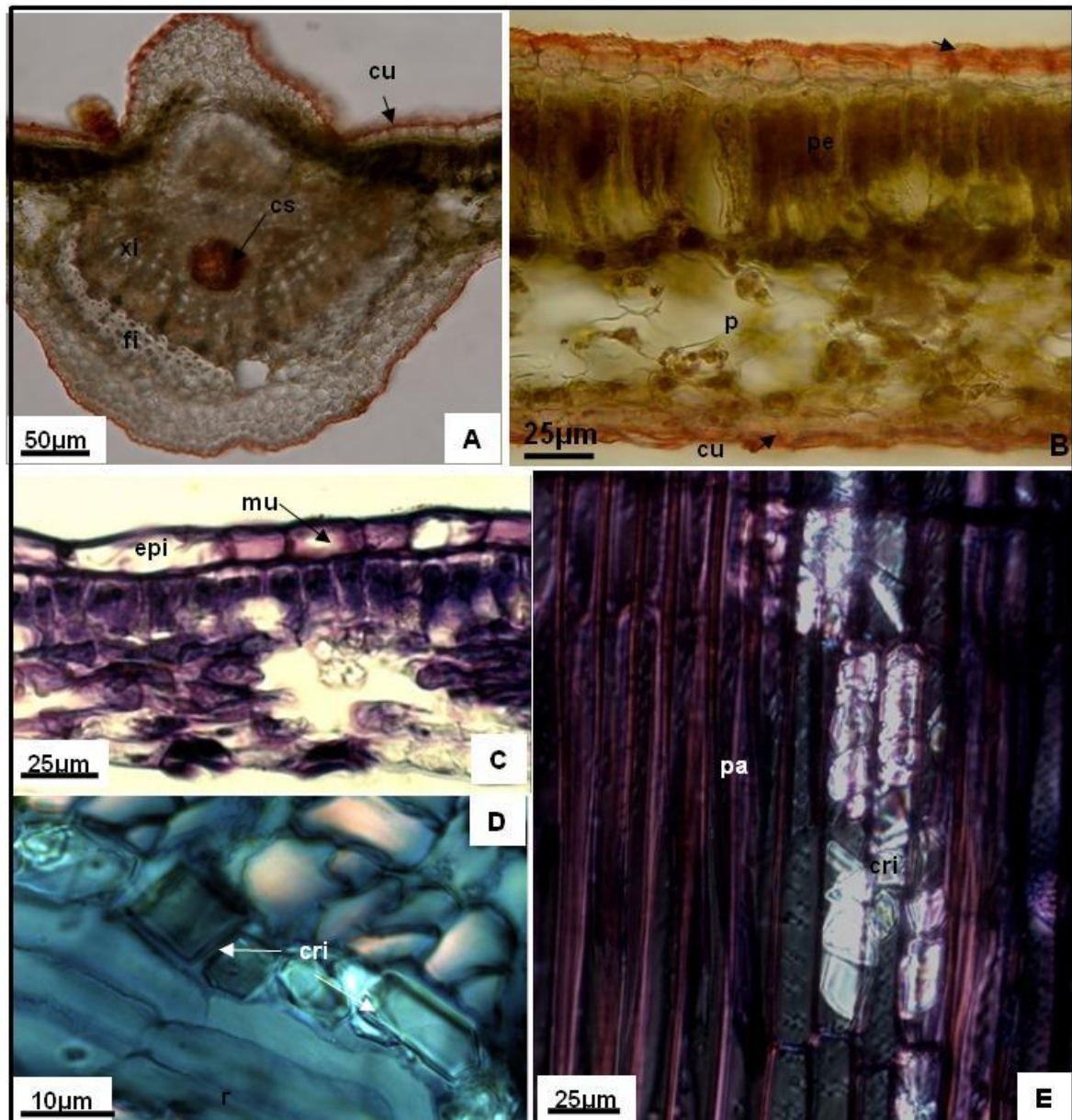
### **ANÁLISIS HISTOQUÍMICO.**

---

Se comprobó la presencia de mucílagos en las células del parénquima en empalizada y en las epidérmicas de los folíolos (Fig. 90C). En los cortes transversales de folíolos teñidos con Sudán IV se observó la presencia de grasas y/o aceites en las cavidades esquizolisígenas presentes en el nervio medio del folíolo y del pecíolo (Fig. 90A). También, se comprobó la presencia de una cutícula de cutina sobre ambas epidermis (Fig. 90B).

La observación de los cortes bajo luz polarizada, permitió detectar la presencia de cristales poliédricos y drusas de gran tamaño en el mesófilo de las hojas, en los radios corticales (Fig. 88D) y en el parénquima radial del leño. (Fig. 90E).





**Figura 90: Análisis Histoquímico de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. A-C:** Foliolo en sección transversal; **A y B:** Tinción con Sudán IV; **A:** Nervio medio; **B:** Semilimbo; **C:** Semilimbo, tinción con violeta de cresilo; **D-E:** Observación con luz polarizada; **D:** Corteza en sección transversal; **E:** Leño en sección longitudinal. **cri:** Cristales de oxalato de calcio; **cu:** Cutícula; **cs:** Cavidad secretora esquizolisígena conteniendo grasas y/o aceites; **epi:** Epidermis; **fi:** Fibras; **mu:** Mucilagos; **p:** Parénquima esponjoso; **pa:** Parénquima axial; **r:** Radio; **xl:** Xilema

## RESULTADOS.

## 1-Rendimiento de los extractos.

Especie	Extracto DCM	Peso material de partida	Peso extracto seco	Rendimiento
<i>Ailanthus altissima</i> (Aa)	Hoja DCM (Aa H <sub>DCM</sub> )	5g	0,16g	3,2%
	Corteza DCM (Aa C <sub>DCM</sub> )	6,8g	0,19g	2,9%
	Madera DCM (Aa M <sub>DCM</sub> )	5,8g	0,02	0,45%
<i>Alvaradoa subovata</i> (As)	Hoja DCM (As H <sub>DCM</sub> )	5g	0,40g	8%
	Corteza DCM (As C <sub>DCM</sub> )	3,8g	0,05g	1,35%
	Madera DCM (As M <sub>DCM</sub> )	5g	0,02g	0,5%
<i>Castela coccinea</i> (Cc)	Hoja DCM (Cc H <sub>DCM</sub> )	20g	0,40g	2%
	Corteza DCM (Cc C <sub>DCM</sub> )	40g	0,65g	1,5%
	Madera DCM (Cc M <sub>DCM</sub> )	40g	0,5g	1,25%
<i>Castela tweedii</i> (Ct)	Hoja DCM (Ct H <sub>DCM</sub> )	2,3g	0,04g	1,8%
	Corteza DCM (Ct C <sub>DCM</sub> )	8,61g	1,19g	1,4%
	Madera DCM (Ct M <sub>DCM</sub> )	8,9g	0,06g	0,65%
<i>Picramnia parvifolia</i> (Pp)	Hoja DCM (Pp H <sub>DCM</sub> )	6,5g	0,34g	5,3%
	Corteza DCM (Pp C <sub>DCM</sub> )	3,7g	0,07g	1,9%
	Madera DCM (Pp M <sub>DCM</sub> )	6g	0,16g	2,7%
<i>Picramnia sellowii</i> (Ps)	Hoja DCM (Ps H <sub>DCM</sub> )	5g	0,18g	3,6%
	Corteza DCM (Ps C <sub>DCM</sub> )	6,1g	0,07g	1,3%
	Madera DCM (Ps M <sub>DCM</sub> )	5,1g	0,02g	0,49%
<i>Picrasma crenata</i> (Pc)	Hoja DCM (Pc H <sub>DCM</sub> )	5g	0,04g	0,8%
	Corteza DCM (Pc C <sub>DCM</sub> )	14,2g	0,06g	0,4%
	Madera DCM (Pc M <sub>DCM</sub> )	12,8g	0,05g	0,4%

Tabla 19: Rendimiento de los extractos diclorometánicos.

Especie	Extractos Etanólicos	Peso material de partida	Peso extracto seco	Rendimiento
<i>Ailanthus altissima</i> (Aa)	Hoja EtOH (Aa H <sub>EtOH</sub> )	5g	0,47g	9,5%
	Corteza EtOH (Aa C <sub>EtOH</sub> )	6g	0,38g	6,4%
	Madera EtOH (Aa M <sub>EtOH</sub> )	4,3g	0,08g	1,9%
<i>Alvaradoa subovata</i> (Aa)	Hoja EtOH (As H <sub>EtOH</sub> )	5g	1,40g	28%
	Corteza EtOH (As C <sub>EtOH</sub> )	3,8g	0,53g	14%
	Madera EtOH (As M <sub>EtOH</sub> )	9g	0,22g	2,4%
<i>Castela coccínea</i> (Cc)	Hoja EtOH (Cc H <sub>EtOH</sub> )	10g	0,65g	6,5%
	Corteza EtOH (Cc C <sub>EtOH</sub> )	10g	0,33g	3,3%
	Madera EtOH (Cc M <sub>EtOH</sub> )	15g	0,36g	2,4%
<i>Castela tweedii</i> (Ct)	Hoja EtOH (Ct H <sub>EtOH</sub> )	8,3g	0,56g	6,7%
	Corteza EtOH (Ct C <sub>EtOH</sub> )	6,5g	0,23g	3,5%
	Madera EtOH (Ct M <sub>EtOH</sub> )	7g	0,19g	2,7%
<i>Picramnia parvifolia</i> (Pp)	Hoja EtOH (Pp H <sub>EtOH</sub> )	7g	1,80g	25%
	Corteza EtOH (Pp C <sub>EtOH</sub> )	3g	0,20g	6,7%
	Madera EtOH (Pp M <sub>EtOH</sub> )	5,1g	0,40g	7,8%
<i>Picramnia sellowii</i> (Ps)	Hoja EtOH (Ps H <sub>EtOH</sub> )	5,1g	1,07g	21,1%
	Corteza EtOH (Ps C <sub>EtOH</sub> )	3,7g	0,47g	12,7%
	Madera EtOH (Ps M <sub>EtOH</sub> )	6,1g	0,19g	3,2%
<i>Picrasma crenata</i> (Pc)	Hoja EtOH (Pc H <sub>EtOH</sub> )	4,8g	0,77g	16%
	Corteza EtOH (Pc C <sub>EtOH</sub> )	11g	0,15g	1,4%
	Madera EtOH (Pc M <sub>EtOH</sub> )	10g	0,07g	0,7%

Tabla 20: Rendimiento de los extractos etanólicos.

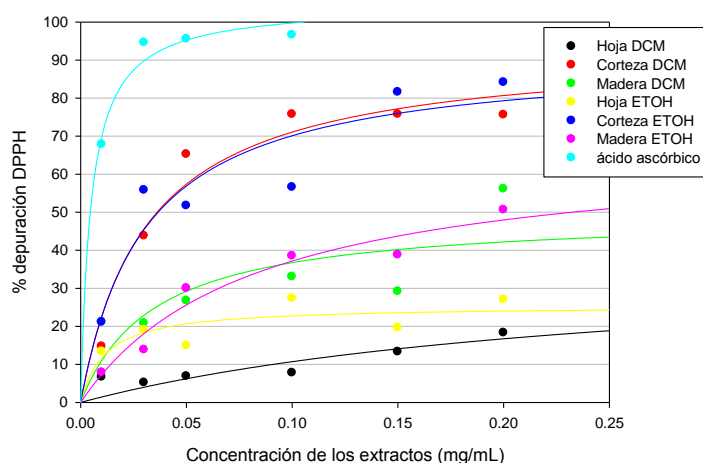
## 2-Actividad Antioxidante: Análisis de la Capacidad Depuradora de Radicales libres.

### 2.1-Análisis cuantitativo.

La capacidad depuradora de radicales libres es un atributo importante de los compuestos antioxidantes y puede ser medida, entre otros, por el ensayo del radical libre DPPH. Este radical, es secuestrado por los compuestos antioxidantes presentes en los extractos mediante la donación de hidrógeno para dar la forma reducida de la molécula de DPPH que es estable. Los radicales antioxidantes formados son estabilizados mediante la formación de productos no-radicales. El radical DPPH es de color violeta en su forma oxidada, y vira al amarillo por la aparición de la forma reducida. Esa variación de color fue evaluada por mediciones de absorbancia a 515 nm. Se evaluó la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos diclorometánicos y etanólicos de hoja, corteza y madera de las siete especies en estudio. Se determinó, para cada extracto, el porcentaje de depuración de DPPH (% depuración DPPH) y la concentración inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>) que es la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir a la mitad la concentración inicial del radical DPPH. Cuanto más bajo es este valor, mayor es el poder depurador del extracto.

### Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de *A. altissima*.

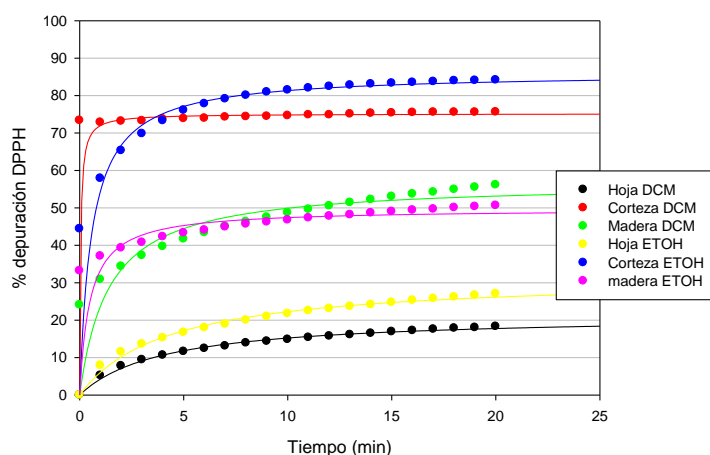
Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig. 91). Los extractos de corteza mostraron una mayor capacidad depuradora del radical DPPH, la misma se produjo en el siguiente orden: Corteza<sub>EtOH</sub> > Corteza<sub>DCM</sub> >> Madera<sub>EtOH</sub> > Madera<sub>DCM</sub> > Hoja<sub>EtOH</sub> > Hoja<sub>DCM</sub>, a los 20 minutos de ensayo.



**Figura 91:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *A. altissima*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

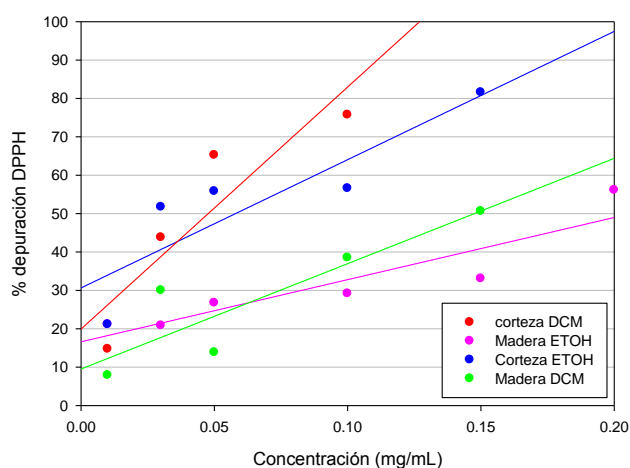


Se observó que todos los extractos alcanzaron el estado estacionario a partir de los 10min. de ensayo, a excepción de Madera<sub>DCM</sub> (Fig 92), que no lo alcanzó dentro de los 20 min. de ensayo. El extracto Corteza<sub>DCM</sub> reacciona de forma rápida con el radical DPPH alcanzando un 74% de inhibición del radical en los primeros minutos de ensayo, con  $CI_{50} = 0,0482\text{mg/mL}$  (Fig. 92 y 93). El extracto Corteza<sub>ETOH</sub> reacciona de forma más lenta pero alcanza un mayor porcentaje de inhibición que el primero (85%) y un  $CI_{50} = 0,0571\text{mg/mL}$ .



**Figura 92:** Comportamiento cinético de los extractos de *A. altissima*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.

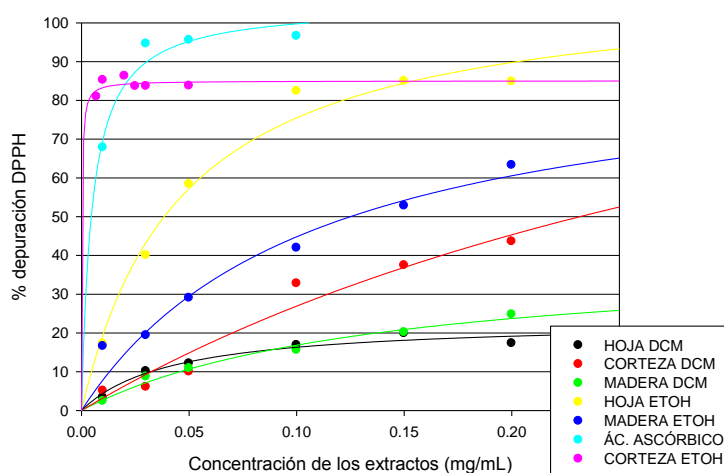
El extracto Madera<sub>DCM</sub> supera el 57% de inhibición y posee un  $CI_{50} = 0,146 \text{ mg/mL}$  a los 20 min. de ensayo, seguido por el extracto Madera<sub>ETOH</sub> que llega a un 50% de inhibición de radical DPPH y un  $CI_{50} = 0,20\text{mg/mL}$  (Fig. 92 y 93). Los extractos de hoja no alcanzan el 50% de inhibición del radical.



**Figura 93:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *A. altissima* a los 20min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

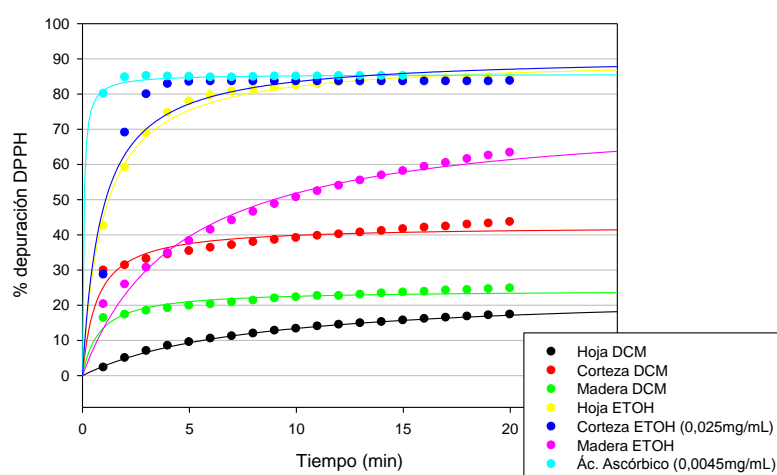
*Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de A. subovata.*

Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig. 94). Los extractos etanólicos mostraron una mayor capacidad depuradora del radical DPPH que los diclorometánicos, y la misma se produjo en el siguiente orden: Corteza<sub>EtOH</sub> >>> Hoja<sub>EtOH</sub> >> Madera<sub>EtOH</sub> > Corteza<sub>DCM</sub> > Madera<sub>DCM</sub> > Hoja<sub>DCM</sub>, a los 20 min. de ensayo.



**Figura 94:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *A. subovata*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

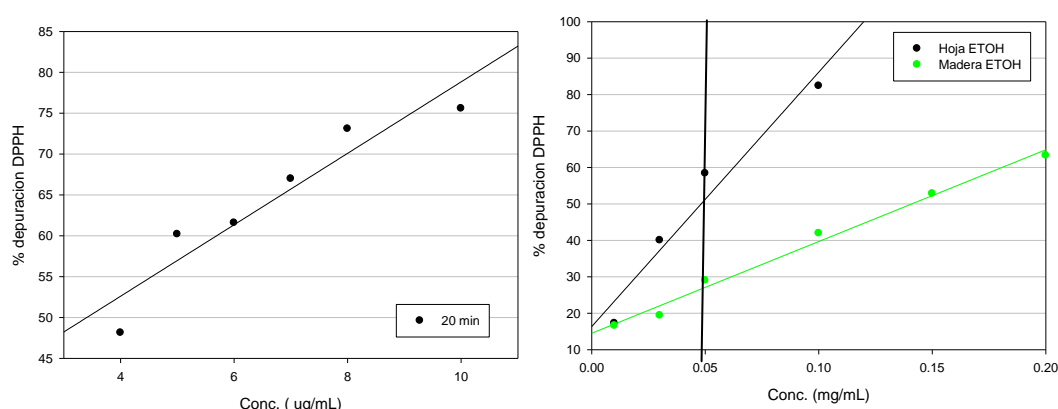
Se observó que todos los extractos alcanzaron el estado estacionario a los 10 min de comenzado el ensayo, a excepción de Madera<sub>EtOH</sub> que no lo alcanzó dentro de los 20 min. de ensayo (Fig. 95).



**Figura 95:** Comportamiento cinético de los extractos de *A. subovata*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2 mg/mL.

El extracto Corteza<sub>EtOH</sub> alcanzó el 83% de depuración de DPPH a los 5 min. de ensayo, siendo el extracto más activo. Para el cálculo de la  $CI_{50}$ , se midió la capacidad depuradora a

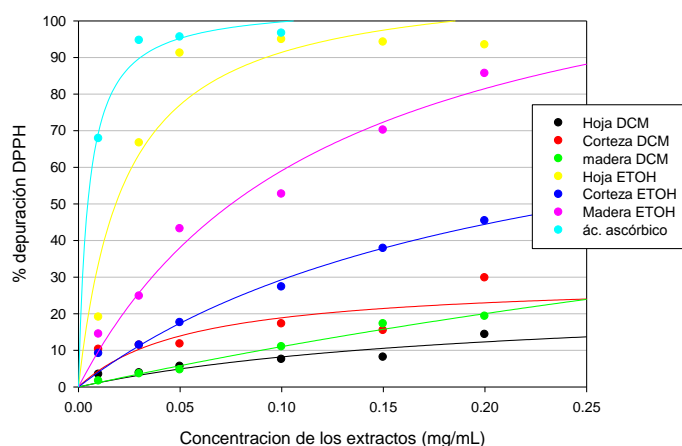
concentraciones mas bajas que para el resto de los extractos. El valor de  $CI_{50}$  para el extracto Corteza<sub>ETOH</sub> fue de 3,62  $\mu\text{g/mL}$ , notablemente menor al determinado para los demás extractos y del mismo orden de magnitud que el control positivo (Fig. 96A). Para Hoja<sub>ETOH</sub> y Madera<sub>ETOH</sub> los valores de  $CI_{50}$  fueron 48,2 y 140,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y para el control positivo se calculó un  $CI_{50} = 2,9 \mu\text{g/mL}$  (Fig. 96B). Las magnitudes de este parámetro para los demás extractos evaluados, no fueron determinadas debido a que los mismos no lograron el 50 % de depuración a pesar de haberse alcanzado el estado “equilibrio” en el ensayo, por lo que se considera que dichos extractos tienen baja actividad depuradora del radical libre DPPH.



**Figura 96:** Actividad depuradora de los extractos de *A. subovata* frente al radical DPPH a los 20 min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la concentración Inhibitoria. **A:** Porcentaje de depuración del extracto Corteza<sub>ETOH</sub> a los 20 min. de ensayo; **B:** Porcentaje de depuración de los extractos Hoja<sub>ETOH</sub> y Madera<sub>ETOH</sub> a los 20 min. de ensayo.

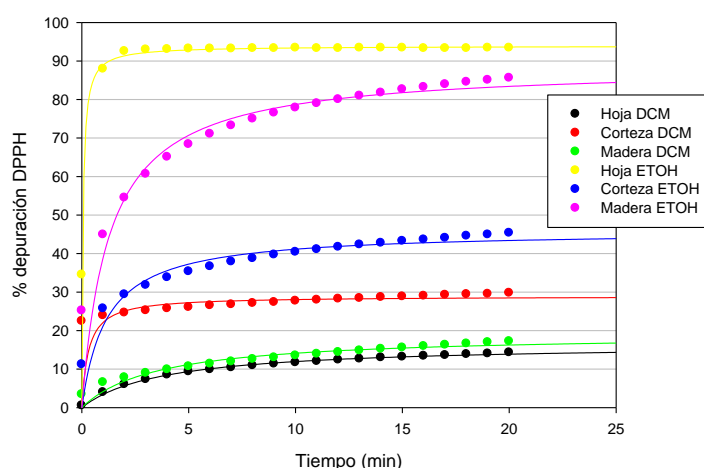
#### *Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de C. coccinea.*

Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig. 97). Los extractos etanólicos mostraron una mayor capacidad depuradora del radical DPPH que los diclorometánicos, y la misma se produjo en el siguiente orden: Hoja<sub>ETOH</sub> > Madera<sub>ETOH</sub> >> Corteza<sub>ETOH</sub> >> Corteza<sub>DCM</sub> > Madera<sub>DCM</sub> > Hoja<sub>DCM</sub>, para una concentración final de extracto de 0,2  $\text{mg/mL}$  y a los 20 min. de ensayo.



**Figura 97:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *C. coccinea*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

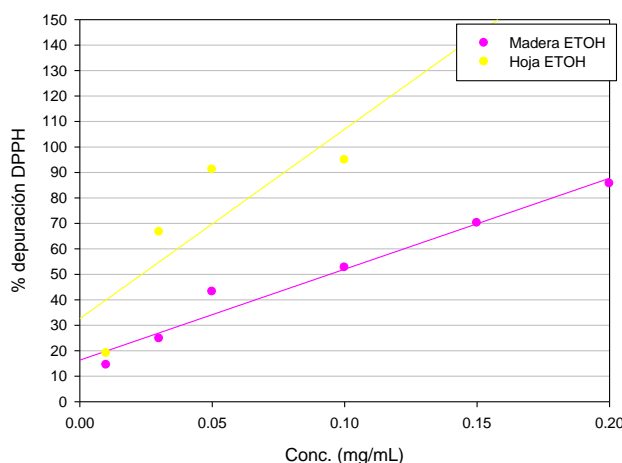
Se observó que todos los extractos alcanzaron el estado estacionario a partir de los 5 min. de ensayo, excepto Madera<sub>ETOH</sub>, este extracto reaccionó de forma más lenta y no alcanzó el equilibrio dentro de los 20 min. que dura el ensayo, sin embargo, fue más activo frente al radical que el extracto Corteza<sub>ETOH</sub> y que los extractos diclorometánicos (Fig. 98).



**Figura 98:** Comportamiento cinético de los extractos de *C. coccinea*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.

El extracto Hoja<sub>ETOH</sub> fue el más activo frente al radical DPPH, alcanzando un 90% de depuración a los 5 min. de ensayo, con un  $CI_{50} = 0,025$  mg/mL, seguido por Madera<sub>ETOH</sub> con un  $CI_{50} = 0,094$ mg/mL y un 85% de depuración a los 15 min. de ensayo (Fig. 98 y 99). Las magnitudes de este parámetro para los demás extractos evaluados, no fueron determinadas debido a que los mismos no alcanzaron el 50 % de depuración en el tiempo de ensayo.

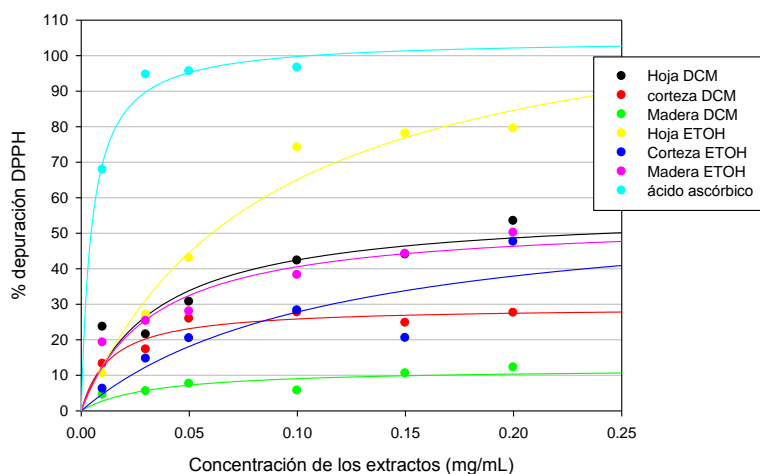




**Figura 99:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *C. coccinea* a los 20 min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

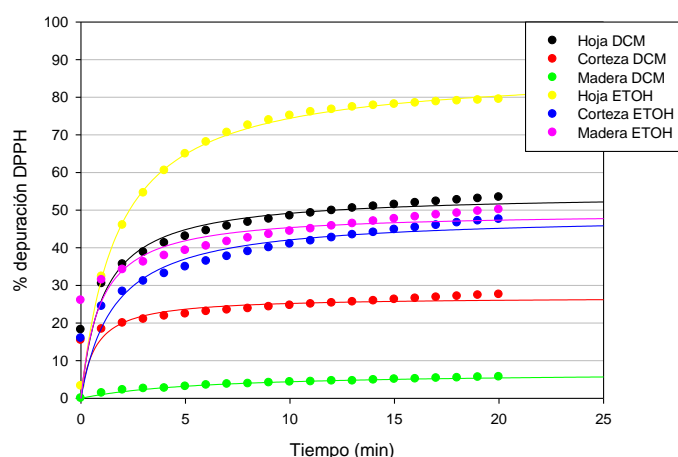
*Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de C. tweedii.*

Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig. 100). El extracto de  $H_{ETOH}$ , mostró la mayor capacidad depuradora del radical DPPH, y la misma se produjo en el siguiente orden:  $Hoja_{ETOH} >> Hoja_{DCM} > Madera_{ETOH} > Corteza_{ETOH} >> Corteza_{DCM} > Madera_{DCM}$ , para una concentración final de extracto de 0,2 mg/mL y a los 20 min. de ensayo.



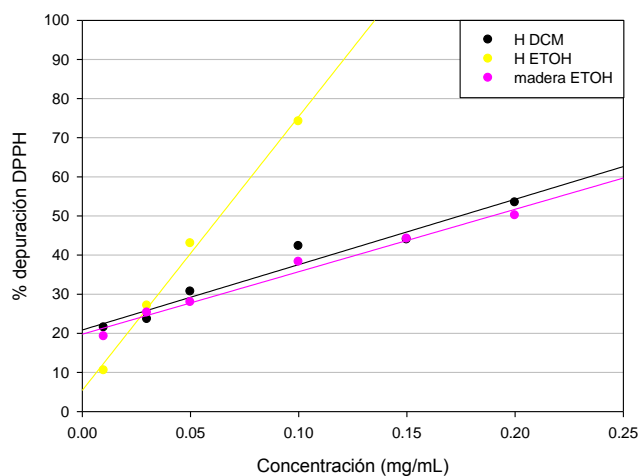
**Figura 100:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *C. tweedii*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

Se observó que todos los extractos alcanzaron el estado estacionario a partir de los 5 min. de ensayo, excepto  $Hoja_{ETOH}$  (Fig. 101). Este extracto reaccionó de forma más lenta y alcanzó el equilibrio a los 20 min. de reacción, sin embargo, fue el extracto más activo frente al radical DPPH, alcanzando un 90% de depuración con un  $CI_{50} = 0,0631$  mg/mL (Fig. 101 y 102).



**Figura 101:** Comportamiento cinético de los extractos de *C. tweedii*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.

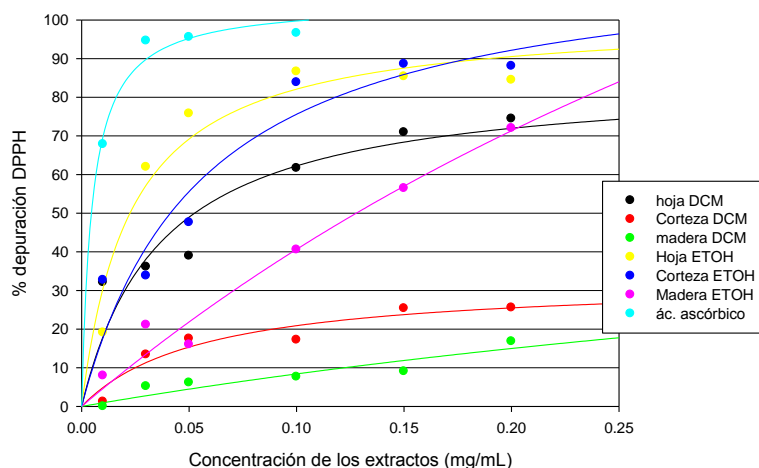
El extracto Hoja<sub>DCM</sub> supera el 50 % de depuración a los 20 min. de ensayo y alcanza una  $CI_{50}$  = 0,173 mg/mL, seguido por el extracto Madera<sub>ETOH</sub> con un  $CI_{50}$  = 0,188 mg/mL (Fig. 102). Las magnitudes de este parámetro para los demás extractos evaluados, no fueron determinadas debido a que los mismos no alcanzaron el 50 % de depuración en el tiempo de ensayo.



**Figura 102:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *C. tweedii* a los 20min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

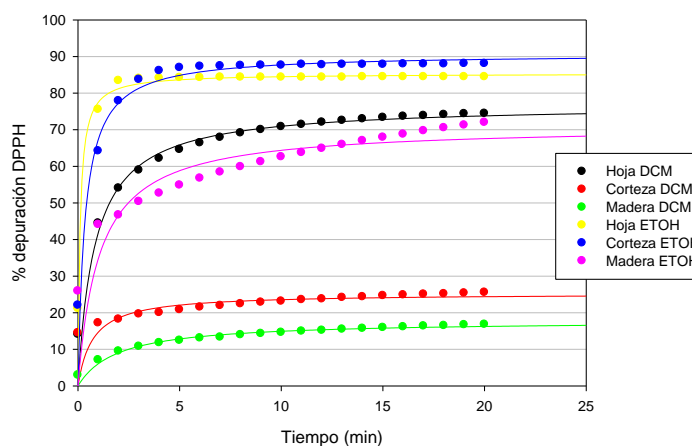
#### *Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de *P. parvifolia*.*

Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig. 103). La capacidad depuradora de los extractos se produjo en el siguiente orden: Hoja<sub>ETOH</sub> > Corteza<sub>ETOH</sub> > Hoja<sub>DCM</sub> > Madera<sub>ETOH</sub> >> Corteza<sub>DCM</sub> > Madera<sub>DCM</sub>, para una concentración final de extracto de 0,2 mg/mL y a los 20 min. de ensayo.

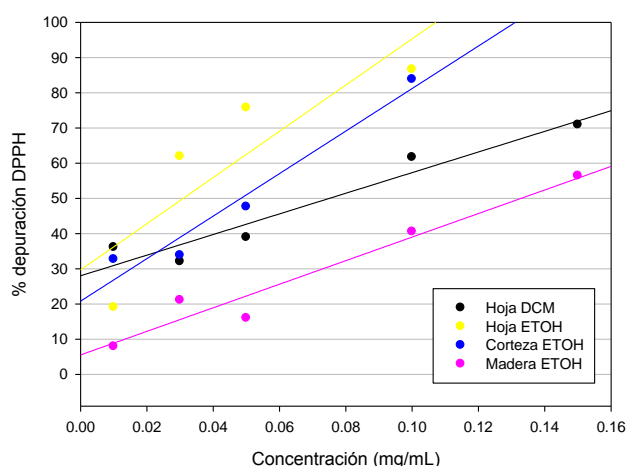


**Figura 103:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *P. parvifolia*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

Se observó que todos los extractos alcanzaron el estado estacionario a los 10 min, de ensayo, excepto Madera<sub>ETOH</sub>, que no lo alcanza dentro de los 20 min. (Fig. 104). Los extractos más activos fueron los de hoja y corteza etanólicos. El extracto Hoja<sub>ETOH</sub> alcanza el 85 % de depuración en los primeros 3 min. de ensayo y luego permanece en estado estacionario, mientras que el extracto Corteza<sub>ETOH</sub> alcanza el mismo valor a los 5 min de ensayo y llega hasta casi el 90 % de depuración dentro de los 10 min. de ensayo. Los valores de  $CI_{50}$  para estos dos extractos fueron de 0,031 mg/mL para el de hoja y 0,0482 mg/mL para la corteza. (Fig.105). El extracto Hoja<sub>DCM</sub> posee un  $CI_{50}$  = 0,075 mg/mL, superior al obtenido para Madera<sub>ETOH</sub>, que fue de 0,13 mg/mL (Fig. 105). Las magnitudes de este parámetro para los demás extractos evaluados, no fueron determinadas debido a que los mismos no alcanzaron el 50 % de depuración en el tiempo de ensayo.



**Figura 104:** Comportamiento cinético de los extractos de *P. parvifolia*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.

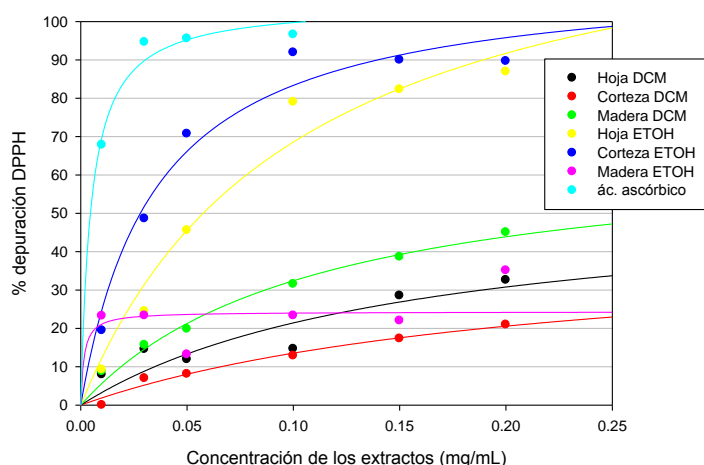


**Figura 105:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *P. parvifolia* a los 20min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

*Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de *P. sellowii*.*

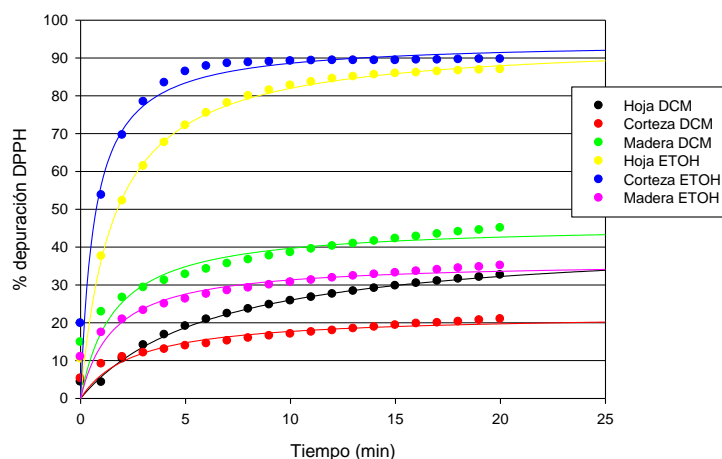
Todos los extractos mostraron actividad depuradora de manera dosis dependiente (Fig.106). La capacidad depuradora de los extractos se produjo en el siguiente orden: Corteza ETOH > Hoja ETOH >> > Madera DCM >Madera ETOH > Hoja DCM >Corteza DCM, para una concentración final de extracto de 0,2 mg/mL y a los 20 min. de ensayo.

Los extractos con mayor actividad no alcanzan el estado estacionario dentro de los 20 min. de ensayo, es decir, reaccionan de forma lenta con el radical DPPH. El más activo, Corteza<sub>ETOH</sub>, alcanza el 90% de depuración de DPPH dentro de los primeros 10 min. de reacción, con un  $CI_{50}$ = 0,038 mg/mL; el siguiente, Hoja<sub>ETOH</sub>, posee un  $CI_{50}$ = 0,061 mg/mL y alcanza el 90 % de depuración del radical a los 20 min. de ensayo (Fig. 107 y 108).



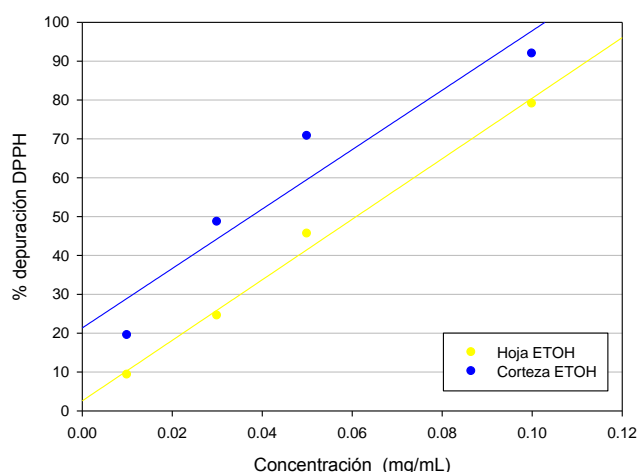
**Figura 106:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *P. sellowii*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.





**Figura 107:** Comportamiento cinético de los extractos de *P. sellowii*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.

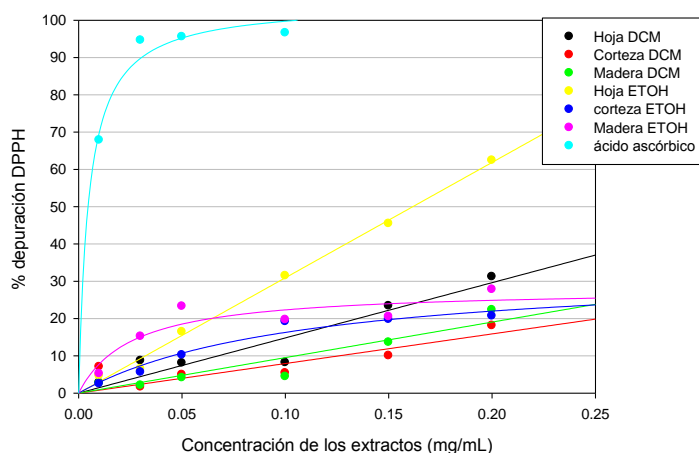
Las magnitudes de este parámetro para los demás extractos evaluados, no fueron determinadas debido a que los mismos no alcanzaron el 50 % de depuración en el tiempo de ensayo (Fig.107).



**Figura 108:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *P. sellowii* a los 20min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

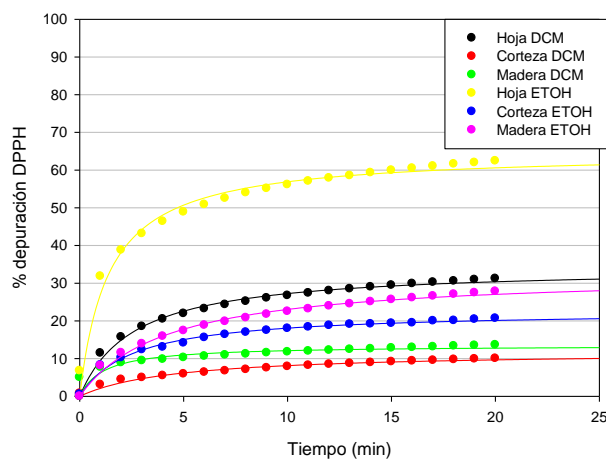
#### *Análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos de P. crenata.*

Los extractos de *P. crenata* no mostraron actividad depuradora del radical DPPH significativa (Fig. 109). Sólo el extracto Hoja<sub>ETOH</sub> supera el 50 % de depuración del radical DPPH a los 20 min. de ensayo. La capacidad depuradora de los extractos se produjo en el siguiente orden: Hoja<sub>ETOH</sub> >>>> Madera<sub>EIOH</sub> > Corteza<sub>EIOH</sub> > Hoja<sub>DCM</sub> > Madera<sub>DCM</sub> > Corteza<sub>DCM</sub>, para una concentración final de extracto de 0,2 mg/mL y a los 20 min. de ensayo.

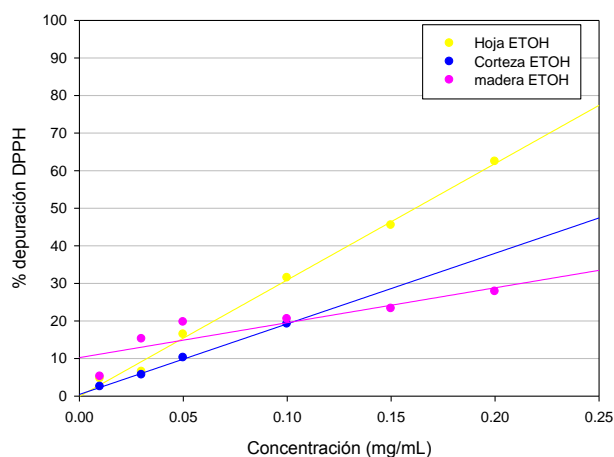


**Figura 109:** Actividad depuradora de radicales libres de los extractos de *P. crenata*. Porcentaje de depuración del radical DPPH en función de distintas concentraciones de extractos a los 20 min. de ensayo.

Los extractos Corteza<sub>DCM</sub>, Madera<sub>DCM</sub> y Corteza<sub>ETOH</sub> alcanzan el estado estacionario a partir de los 10 min. de reacción pero no superan el 30% de depuración, los extractos Hoja<sub>DCM</sub> y Madera<sub>ETOH</sub> lo hacen a partir de los 15 min. de ensayo sin alcanzar el 50% de depuración del radical DPPH (Fig. 110); solo el extracto Hoja<sub>ETOH</sub>, supera un 63 % de depuración del radical con un  $CI_{50} = 0,161 \text{ mg/mL}$  (Fig. 110 y 111).



**Figura 110:** Comportamiento cinético de los extractos de *P. crenata*. Porcentaje de depuración en función del tiempo para una concentración de los extractos de 0,2mg/mL.



**Figura 111:** Porcentaje de depuración de DPPH en función de la concentración de los extractos *P. crenata* a los 20min. de ensayo. Extrapolación lineal para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

#### Discusión Breve de los Resultados.

Los resultados de los porcentajes de depuración del radical DPPH y las  $CI_{50}$  de todos los extractos se expresan en forma comparativa en las tablas 21 y 22 respectivamente:

% depuración de DPPH	Hoja <sub>DCM</sub>	Hoja <sub>ETOH</sub>	Corteza <sub>DCM</sub>	Corteza <sub>ETOH</sub>	Madera <sub>DCM</sub>	Madera <sub>ETOH</sub>
<i>A. altissima</i>	18%	27%	75%	85%	56%	50%
<i>A. subovata</i>	17%	83%	44%	84%	24%	63%
<i>C. coccinea</i>	13%	93%	30%	46%	17%	86%
<i>C. tweedii</i>	54%	80%	28%	47%	7%	50%
<i>P. parvifolia</i>	75%	84%	26%	88%	16%	72%
<i>P. sellowii</i>	33%	87%	21%	89%	45%	35%
<i>P. crenata</i>	32%	63%	10%	21%	13%	28%

**Tabla 21:** Porcentajes de inhibición del radical DPPH de los extractos a los 20 min. de ensayo

<b>CI 50 (mg/mL)</b>	<b>Hoja<sub>DCM</sub></b>	<b>Hoja<sub>ETOH</sub></b>	<b>Corteza<sub>DCM</sub></b>	<b>Corteza<sub>ETOH</sub></b>	<b>Madera<sub>DCM</sub></b>	<b>Madera<sub>ETOH</sub></b>
<b><i>A. altissima</i></b>	-	-	0,0482	0,057	0,146	0,200
<b><i>A. subovata</i></b>	-	0,0482	-	0,0036	-	0,140
<b><i>C. coccinea</i></b>	-	0,025	-	-	-	0,094
<b><i>C. tweedii</i></b>	0,173	0,0631	-	-	-	0,188
<b><i>P. parvifolia</i></b>	0,075	0,031	-	0,048	-	0,134
<b><i>P. sellowii</i></b>	-	0,061	-	0,038	-	-
<b><i>P. crenata</i></b>	-	0,161	-	-	-	-
<b>Ácido ascórbico</b>	0,0029					

**Tabla 22:** Concentración inhibitoria del 50 % de la concentración inicial de DPPH a los 20 min. de ensayo.

Los extractos etanólicos fueron más activos frente al radical DPPH que los respectivos diclorometánicos. En general, los extractos diclorometánicos no superaron el 50% de inhibición del radical, salvo los extractos de corteza y hoja de *A. altissima*: El extracto diclorometánico de hoja alcanzo el 75 % de inhibición del radical al igual que el extracto diclorometanico de corteza, sin embargo los correspondientes extractos etanolicos alcanzaron un porcentaje de inhibición mayor, es decir, el extracto H<sub>DCM</sub> alcanzó un 75% de inhibición y el extracto H<sub>ETOH</sub> alcanzó en 84 %, lo mismo sucede con la corteza, C<sub>DCM</sub> presento un 75% y C<sub>ETOH</sub> un 85%, esto podría deberse a la presencia de un tipo de compuesto presente en ambos extractos aunque en mayor concentracion en los etanólicos.

Para *C. coccinea*, *C. tweedii* y *P. crenata*, los extractos etanólicos de hoja fueron más activos que los de corteza y madera, mientras que, para *A. subovata*, *P. parvifolia* y *P. sellowii* los extractos etanolicos más activos fueron los de corteza, seguidos por los de hoja y por último los de madera. El extracto más activo fue el etanólico de corteza de *A. subovata*, con una CI<sub>50</sub>=0,0036mg/mL, valor mucho mas bajo que el de los restantes extractos activos y del mismo orden de magnitud que el control positivo utilizado: el ácido ascórbico, reconocido compuesto antioxidante. Sin embargo, este extracto alcanza el 84% de depuración dentro de los 20 min. de ensayo, mientras que el extracto etanólico de Hoja de *C. coccinea*, cuyo CI<sub>50</sub> es mayor al de *A. subovata* (CI<sub>50</sub>= 0,025mg/mL), supera el 93% de depuración de DPPH y es el extracto que alcanza el mayor porcentaje de depuración dentro de los 20 min. de ensayo.



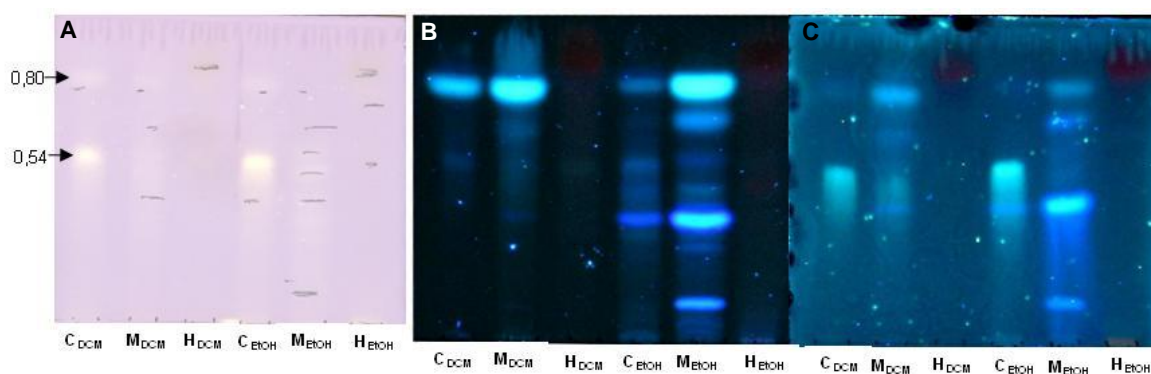
## 2.2-Análisis cualitativo.

Los extractos que superaron el 50% de depuración del radical DPPH dentro del tiempo que duró el ensayo, que es el tiempo durante el cual el radical DPPH permanece estable, fueron evaluados de forma cualitativa para caracterizar los compuestos responsables de la actividad antioxidante de cada extracto.

Para la evaluación cualitativa de los extractos con actividad depuradora de radicales libres se utilizó CCD, utilizando una solución etanólica de DPPH como revelador. Los compuestos con capacidad antioxidante revelan como bandas amarillas sobre un fondo púrpura, dependiendo su intensidad de la cantidad y naturaleza del compuesto antioxidante (Argolo, 2004).

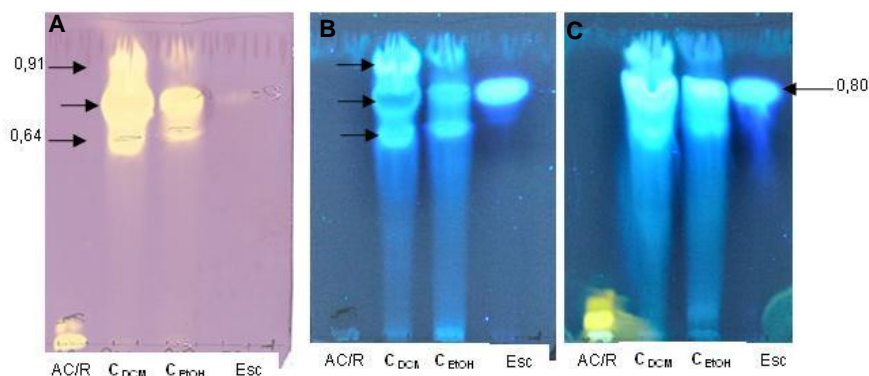
### *Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de A. altissima.*

Los extractos evaluados reaccionaron de forma rápida e intensa con el radical DPPH, casi con la misma intensidad que los controles positivos (patrones de referencia comerciales rutina y ácido clorogénico). En la primer fase móvil utilizada (FM: diclorometano/metanol, Fig.112A) se observaron mayor cantidad e intensidad de bandas correspondientes a compuestos antioxidantes en los extractos de  $C_{EtOH}$  y  $C_{DCM}$  que en los de  $M_{EtOH}$  y  $M_{DCM}$  coincidiendo con los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo, donde los extractos de corteza fueron más activos que los de madera y hojas. La banda con actividad depuradora del radical DPPH más intensa de  $R_f=0,54$ , presente en los extractos  $C_{EtOH}$  y  $C_{DCM}$ , presentó coloración azul al revelar la placa con RPN, pudiendo ser, por sus características de revelado (Warner y Bladt, 2001), un ácido fenilcarboxílico o cumarina (Fig.112B y C). La banda de  $R_f=0,8$  de menor intensidad al revelar con DPPH, presente en los cuatro extractos, presentó las mismas características de revelado.



**Figura 112:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. altissima*. FE: silica gel, FM: diclorometano/metanol (95:0,5). Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** Observación bajo luz UV 365nm; **C:** RPN, observación bajo luz UV 365nm.

Se cromatografiaron los extractos  $C_{EtOH}$  y  $C_{DCM}$  (FM: diclorometano/metanol, Fig.113), junto con los patrones de referencia comerciales de ácido clorogénico, rutina y escopoletina. Se observaron al menos tres bandas con actividad depuradora del radical DPPH en cada uno de los extractos. Una de las bandas, de  $R_f = 0,8$  (Fig. 113), presente en ambos extractos, coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de escopoletina. Sin embargo, la escopoletina no presenta capacidad depuradora de DPPH significativa (Fig. 113A). Existe un compuesto con el mismo  $R_f$  e iguales características de revelado que la escopoletina, que es el responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante del extracto (Fig.113B y C).



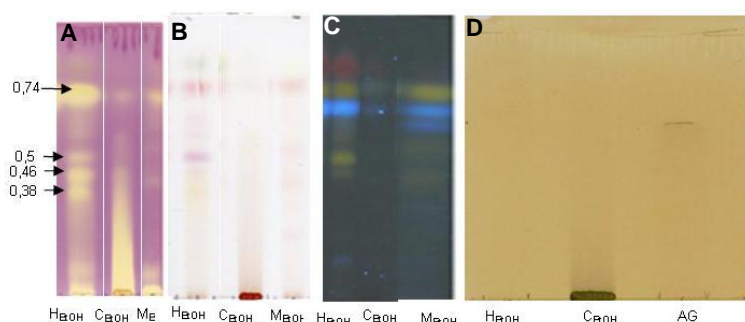
**Figura 113:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. altissima*. FM: diclorometano/metanol (9:1). Reveladores: **A**, solución etanólica de DPPH; **B**, observación bajo luz UV 365nm; **C**, RPN, observación bajo luz UV 365nm. AC: ácido clorogénico; R: rutina; Esc: escopoletina.

#### *Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de A. subovata.*

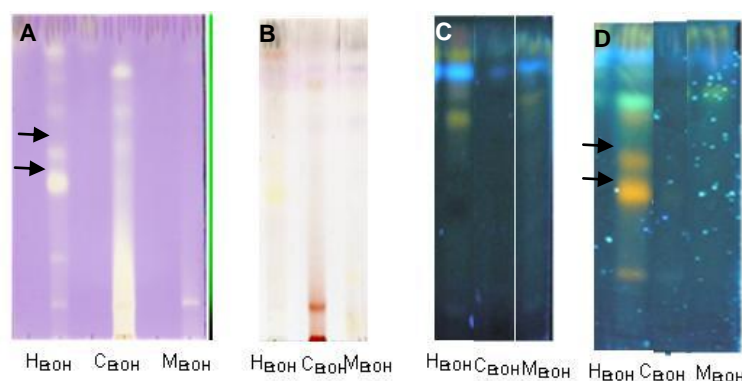
Se evaluó cualitativamente la capacidad depuradora de los extractos etanólicos de hoja, corteza y madera de *A. subovata*, que fueron los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH. Los extractos analizados reaccionaron de manera rápida e intensa con el radical libre DPPH, pudiéndose visualizar bandas con actividad antioxidante en los tres extractos evaluados. Las bandas con actividad depuradora de DPPH de  $R_f$ : 0.74 y 0.5 por sus características de revelado, coloración rojiza con luz visible y amarilla bajo luz UV de 365nm al revelar la placa con Reactivo de Börntrager (Wagner y Bladt, 2001), corresponderían a antraquinonas (Fig. 114B y C). Las bandas de  $R_f = 0,46$  y  $0,37$  presentes en los tres extractos, podrían corresponderse con flavonoides puesto que presentaron coloración amarilla/naranja al revelar la placa con RPN. En el extracto  $C_{EtOH}$ , la mayor parte de los compuestos con capacidad antioxidante permanecieron en el punto de siembra, sugiriendo una naturaleza más polar de los mismos. Dichos compuestos revelaron positivamente, al rociar la placa con una solución de  $FeCl_3$  al 10 %, sugiriendo una naturaleza polifenólica de los mismos, probablemente taninos (Fig. 114D).

En un nuevo sistema cromatográfico (Fig. 115), los compuestos con capacidad antioxidante en el extracto  $C_{EtOH}$  no revelaron con RPN, y se observaron dos bandas que adquirieron coloración rojiza al revelar la placa con Rvo. de Börntrager (Fig. 115B). En el extracto de Hoja $_{EtOH}$  las bandas con actividad depuradora se correspondieron, por sus características de revelado, con flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos (Fig.115D). Con el fin de caracterizar los flavonoides presentes en el extracto Hoja $_{EtOH}$ , se realizó una CCD en la que se sembró dicho extracto y cinco patrones de referencia comerciales de flavonoides (Fig. 116). Se observaron tres bandas en el extracto Hoja $_{EtOH}$  al revelar con DPPH (Fig. 116A): la de mayor intensidad ( $R_f= 0,37$ ) coincidió en  $R_f$  y características de tinción con el patrón de referencia comercial de rutina. Además, se observaron otras bandas características de flavonoides en este extracto. Por otra parte, se distinguieron en el extracto Hoja $_{EtOH}$  compuestos que presentaron fluorescencia amarilla bajo luz UV a 365nm (Fig. 116B) y que al UV a 254 nm, extinguen la fluorescencia, pudiendo tratarse de antraquinonas, como ya se observó en la anterior fase móvil utilizada (Fig. 114).

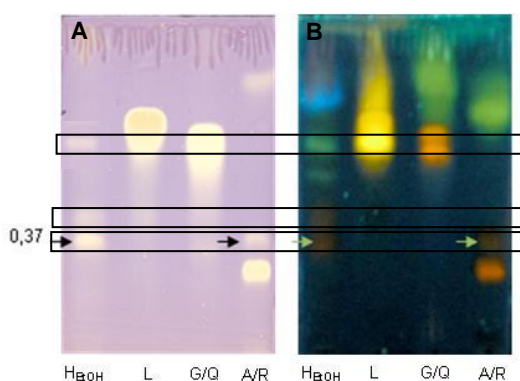
El extracto  $C_{EtOH}$  se cromatografió en una fase móvil de mayor polaridad junto con los patrones de referencia comercial de rutina, ácido clorogénico, ácido gálico, escopoletina y emodina (Fig. 117). Se observó una gran cantidad de bandas con actividad depuradora del radical DPPH (Fig. 117B). Una de las bandas, de  $R_f= 0,40$ , coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia rutina (Fig. 117D). Las bandas de  $R_f=0,85$  y  $0,75$ , y las de mayor polaridad de  $R_f= 0,21$  y  $0,07$ , revelaron con solución de  $FeCl_3$  al 10 % (Fig. 117C), por lo tanto, podríamos decir que se trata de compuestos de naturaleza polifenólica, en particular taninos. El extracto  $C_{EtOH}$  junto con los patrones de referencia comercial de rutina y ácido clorogénico fue sembrado en un nuevo sistema (Fig. 118) donde se observó nuevamente la presencia de una banda muy tenue que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia de rutina (Fig. 118D), siendo este flavonoide uno de los compuestos responsables de la actividad antioxidante del extracto.



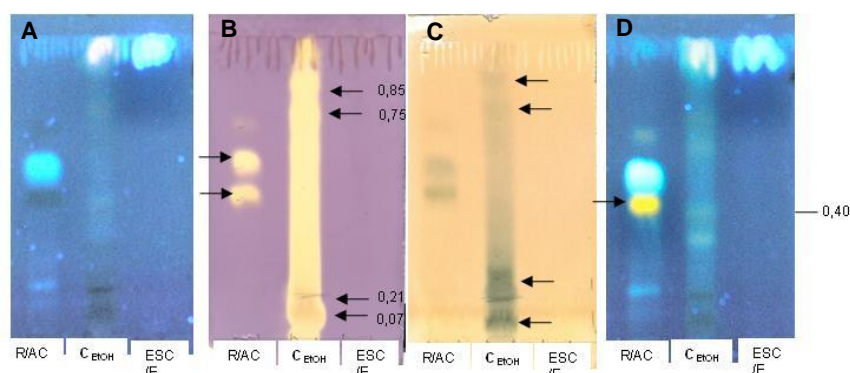
**Figura 114:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. subovata*. **FE:** silica gel. **FM:** acetato de etilo/metanol/agua (100:13,5:10); **A:** revelado con solución etanólica de DPPH; **B:** revelado con Rvo. Bortranger, observación con luz visible; **C:** revelado con Rvo de Bortranger observación bajo luz de 365nm; **D:** revelado con solución  $FeCl_3$  10%. **AG:** ácido gálico.



**Figura 115:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. subovata*. **FE:** Silica gel. **FM:** Acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (100:11:11:26). **A:** Revelado con solución etanólica de DPPH; **B:** Revelado con rvo. de Börntrager; **C:** Observación bajo luz UV 365nm; **D:** Revelado con RPN bajo luz UV365nm:

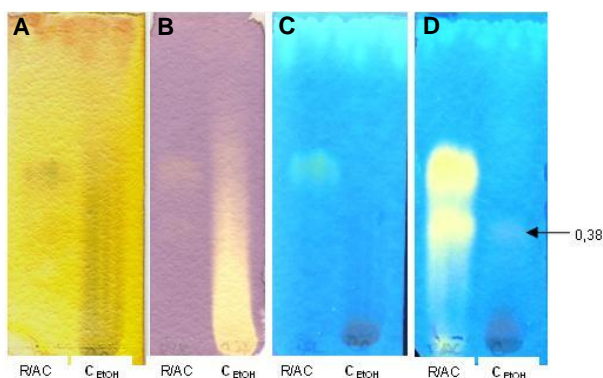


**Figura 116:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. subovata*. **FM:** Cloroformo/ácido acético/metanol/agua (60:32:12:8); Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** RPN bajo luz UV 365nm; **L:** Luteolina; **G/Q:** Genkwanina, quercetina; **A/R:** Apigenina, rutina.



**Figura 117:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. subovata*. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11:26); Reveladores: **A:** Observación bajo luz UV365nm; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Solución  $\text{FeCl}_3$  10%; **D:** RPN. **R:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico; **ESC:** Escopoletina; **E:** Emodina.





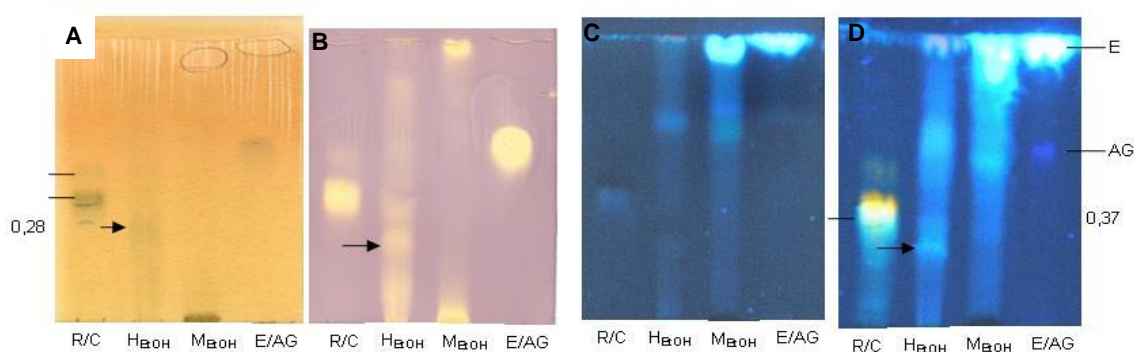
**Figura 118:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *A. subovata*. **FE:** Celulosa; **FM:** Ácido acético 15%. Reveladores: **A:** Solución  $\text{FeCl}_3$  10%; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Observación bajo luz UV 365nm; **D:** RPN. **R:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico.

*Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de *C. coccinea*.*

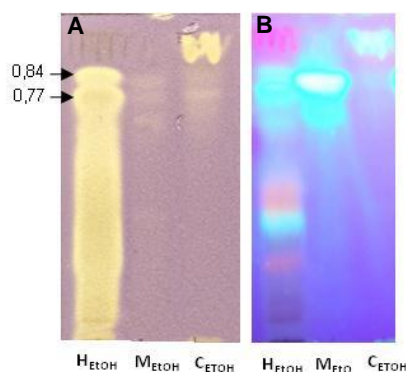
Se evaluaron los extractos etanólicos de hoja, corteza y madera de *C. coccinea*. Todos los extractos reaccionaron de forma rápida e intensa con el radical libre DPPH, casi con la misma intensidad que los controles positivos (patrones de referencia comercial de rutina, ácido clorogénico y ácido gálico).

En la primer fase móvil utilizada (cloroformo/ác. acético/metanol/agua, Fig.119), se observó mayor cantidad e intensidad de bandas con actividad depuradora del radical DPPH en el extracto  $\text{H}_{\text{EtOH}}$  que en el  $\text{M}_{\text{EtOH}}$  (Fig. 119B), coincidiendo con los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo. En el extracto  $\text{H}_{\text{EtOH}}$  las bandas con actividad antioxidante se correspondieron con ácidos fenilcarboxílicos, puesto que revelaron de color azul al rociar la placa con RPN (Fig.119D), y con compuestos polifenólicos, debido a que revelaron con solución de  $\text{FeCl}_3$  (Fig.119A). En el extracto  $\text{M}_{\text{EtOH}}$  las bandas con actividad antioxidante se correspondieron, por sus características de revelado, con ácidos fenilcarboxílicos. Al cromatografiar los extractos en una fase móvil de mayor polaridad (FM: acetato de etilo/etanol/agua, Fig.120) se observó nuevamente, mayor cantidad e intensidad de bandas en el extracto  $\text{H}_{\text{EtOH}}$  que en los  $\text{M}_{\text{EtOH}}$  y  $\text{C}_{\text{EtOH}}$ , las mismas, por sus características de revelado, se correspondieron con ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides en el extracto de hoja, y con ácidos fenilcarboxílicos en los de corteza y madera (Fig.120B).

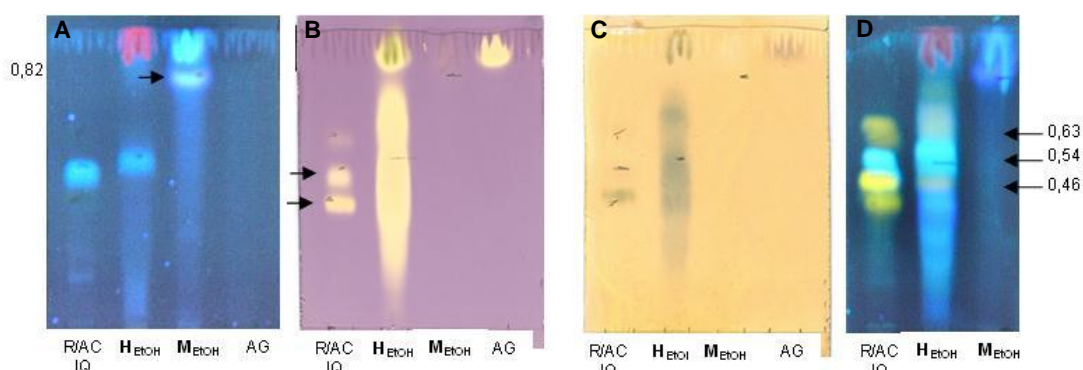
Por último, se cromatografiaron los extractos junto con patrones de referencia comerciales de rutina, isoquercitrina y ácido clorogénico en la fase móvil: acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (Fig.121). Se observó, en el extracto  $\text{H}_{\text{EtOH}}$  una banda que coincide en  $R_f$  ( $R_f = 0,46$ ) y color con el patrón de referencia comercial de rutina y otra, de  $R_f = 0,54$ , coincidió en  $R_f$  y color con patrón de referencia de ácido clorogénico (Fig.121B y C). Estos compuestos serían responsables de parte de la capacidad depuradora de radicales libres del extracto.



**Figura 119:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. coccinea*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Cloroformo/ác. acético/metanol/agua (60:32:12:8). Reveladores: **A:** Solución  $\text{FeCl}_3$  al 10%; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** observación bajo luz UV 365nm; **D:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **R:** Rutina; **C:** Ácido clorogénico; **E:** Escopoletina; **AG:** Ácido gálico.



**Figura 120:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. coccinea*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/etanol/agua (7,5:1,5:0,8). Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** RPN, observación bajo luz UV 365nm.



**Figura 121:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. coccinea*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11: 26). Reveladores: **A:** observación bajo luz UV 365nm; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Solución  $\text{FeCl}_3$  al 10%; **D:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **R:** Rutina; **C:** Ácido clorogénico; **IQ:** Isoquercitrina; **AG:** Ácido gálico.

*Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de C. tweedii.*

Se evaluaron los extractos  $H_{EtOH}$ ,  $H_{DCM}$  y  $M_{EtOH}$ , que fueron los más activos inhibiendo al radical DPPH en los ensayos cuantitativos. Los extractos evaluados reaccionaron de forma rápida e intensa con el radical DPPH, casi con la misma intensidad que los controles positivos (patrones de referencia comerciales de rutina y ácido clorogénico).

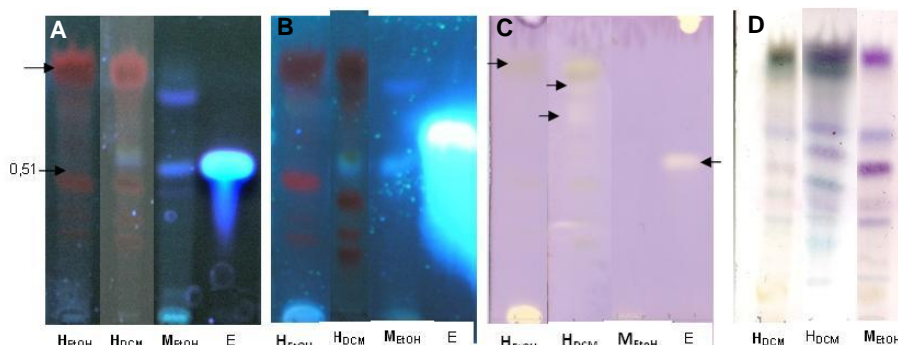
La elución de los extractos en la primer fase móvil (FM: diclorometano/metanol, (Fig. 122) reveló la presencia de bandas correspondientes a compuestos con actividad antioxidante de distintas polaridades en cada uno de los extractos (Fig.122C). En el extracto  $H_{EtOH}$ , los compuestos con actividad depuradora permanecen en el punto de siembra, siendo estos de mayor polaridad que los presentes en el extracto  $H_{DCM}$  y  $M_{EtOH}$ . Las bandas de coloración rojiza presentes en  $H_{DCM}$  y  $H_{EtOH}$  se corresponden, por sus características de revelado, con las clorofilas y poseen muy leve capacidad depuradora de DPPH (Fig.122A y B). En el extracto  $M_{EtOH}$  y en Hoja $_{DCM}$ , se observó una banda con igual  $R_f$  y coloración que el patrón de referencia comercial de escopoletina (Fig. 122A y B).

La elución del extracto  $H_{EtOH}$ , en una fase móvil de mayor polaridad: AcoEt/Ac. Acético/Ac. Fórmico/ $H_2O$  (Fig.123), reveló la presencia de 4 bandas con actividad depuradora del radical DPPH (Fig.123 B). Dichas bandas, por sus características de revelado, se correspondieron a compuestos de naturaleza polifenólica, pudiendo ser estos flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos. Entre ellos se observó la presencia de una banda que coincidió en  $R_f$  ( $R_f = 0,43$ ) y coloración con el patrón de referencia comercial de rutina, y otra banda con  $R_f = 0,62$  y coloración azul/verdosa que coincidió con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico (Fig.123A).

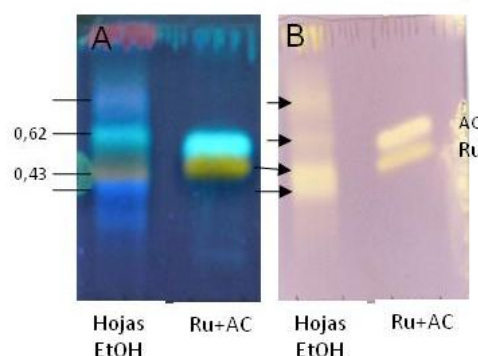
En la siguiente fase móvil (FM: Cloroformo/Ac. Acético/ metanol/  $H_2O$ , Fig.124) se observaron 5 bandas que revelaron con DPPH (Fig.124B). Las bandas con  $R_f$ : 0,31, 0,16 y 0,1 revelaron con  $FeCl_3$ , pudiendo ser estas compuestos de naturaleza polifenolica, principalmente taninos y ácidos fenilcarboxílicos (Fig.124C). Las bandas con actividad antioxidante de  $R_f = 0,38$  y mayores revelan con RPN y corresponderían a flavonoides y ácidos fenólicos. Se observó nuevamente una banda, de  $R_f = 0,43$ , que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de rutina, y otra de  $R_f = 0,38$  que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico (Fig.124A).

En la tercer fase móvil utilizada (FM: ácido acético al 15%, Fig. 125) las bandas con actividad antioxidante, por sus características de revelado, también se correspondieron con flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos (Fig.125A, B). Se verifica en este sistema, la presencia de una banda de  $R_f = 0,52$  y color naranja al revelar con RPN, que coincide en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de rutina, y la banda de  $R_f = 0,72$  y color azul/verdoso coincidente en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico. De

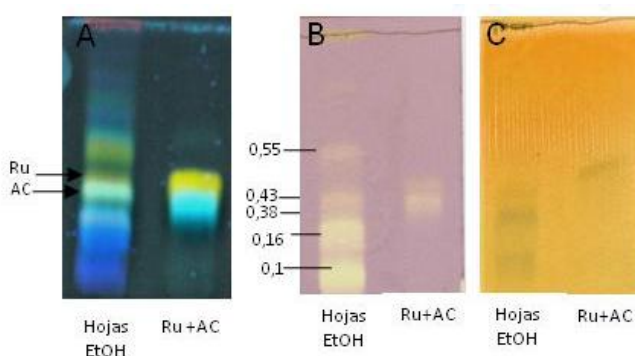
esta forma se confirma, la presencia de rutina y ácido clorogénico en el extracto etanólico de hoja de *C. tweedii*



**Figura 122:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. tweedii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Diclorometano/metanol (9:1). Reveladores: **A:** Observación bajo luz UV 365nm; **B:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **C:** Solución etanólica de DPPH; **D:** Anisaldehído sulfúrico. **E:** Escopoletina

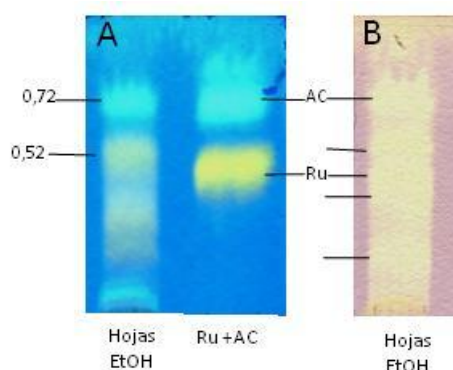


**Figura 123:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. tweedii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11:26). Reveladores: **A:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **B:** solución etanólica de DPPH. **Ru:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico.



**Figura 124:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. tweedii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Cloroformo/ác. acético/metanol/agua (60:32:12:8). Reveladores: **A:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%. **Ru:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico.





**Figura 125:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *C. tweedii*. **FE:** Celulosa. **FM:** Ácido acético 15%. Reveladores: **A:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **B:** Solución etanólica de DPPH. **Ru:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico.

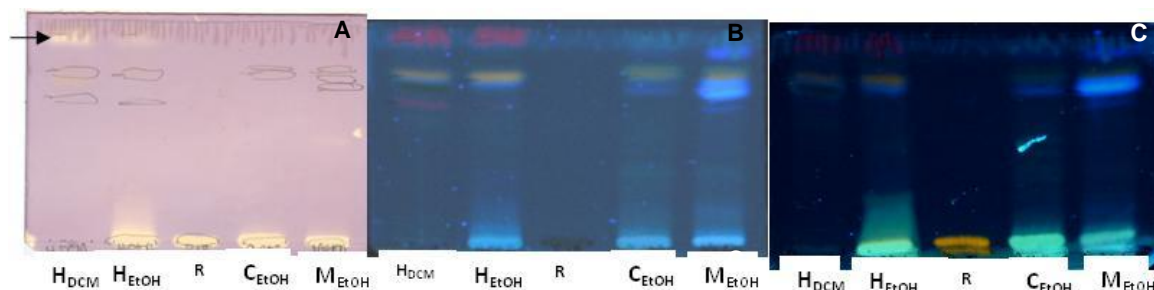
*Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de *P. parvifolia*.*

Se evaluaron los extractos de  $H_{EtOH}$ ,  $H_{DCM}$ ,  $C_{EtOH}$  y  $M_{EtOH}$ , que fueron los más activos en el ensayo cuantitativo. Todos los extractos reaccionaron de forma rápida e intensa con el radical DPPH, con la misma intensidad que los controles positivos (patrones de referencia comercial de rutina, ácido clorogénico y ácido gálico). En el primer sistema cromatográfico utilizado (FM: diclorometano/metanol, Fig.126) los compuestos con actividad antioxidante permanecieron en el punto de siembra en los extractos etanólicos (Fig.126A). Las bandas adquirieron coloración azul/verdosa bajo luz UV de 365nm e incrementaron su fluorescencia al revelar la placa con el RPN, por lo tanto, podría tratarse de flavonoides y/o ácidos fenilcarboxílicos (Fig.126B y C). En los extractos de  $H_{EtOH}$  y  $H_{DCM}$  se observaron además, bandas con actividad antioxidante de baja intensidad que se desplazaron con el frente de corrida, estas adquirieron coloración rojiza bajo luz UV de 365nm e incrementaron su fluorescencia al revelar con RNP, correspondiéndose a las clorofilas características de las hojas.

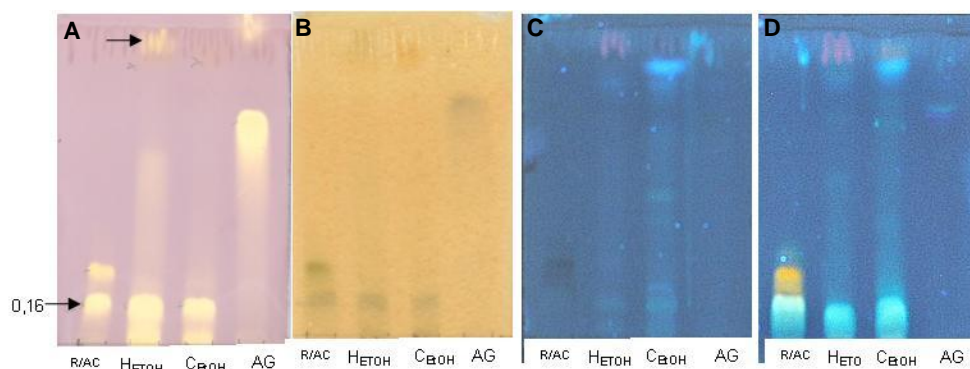
En la siguiente fase móvil utilizada (Fig. 127), se observó una banda con actividad antioxidante de  $R_f=0,16$  presente en los dos extractos (Fig.127A), que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico; este compuesto sería responsable, en parte, de la actividad depuradora del radical DPPH en estos extractos. El resto de las bandas con actividad antioxidante presentes en el extracto  $H_{EtOH}$  se correspondieron con compuestos fenilcarboxílicos por su coloración azul/ celeste con RPN (Fig.127C y D).

Finalmente, se corrieron los extractos  $H_{EtOH}$  y  $C_{EtOH}$ , junto con los patrones de referencia comercial de ácido clorogénico y rutina en una nueva fase móvil (FM: acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua, Fig.128). Se observó nuevamente una banda de  $R_f=0,46$  y coloración azul/celeste, presente en ambos extractos, que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico (Fig.128B, C y D), confirmando que este ácido

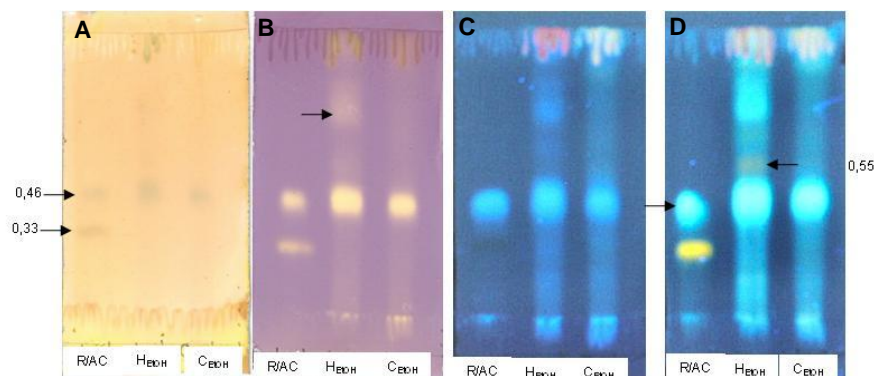
fenilcarboxílico es uno de los compuestos responsables parciales de la actividad antioxidante en estos extractos. Se observaron bandas de mayor intensidad en el extracto  $H_{EtOH}$  que en el de corteza, estas bandas revelaron azul/celeste al rociar la placa con RPN (Fig.128C y D), pudiendo ser estos ácidos fenilcarboxílicos.



**Figura 126:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. parvifolia*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Diclorometano/metanol (9:1) Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** Observación bajo luz UV 365nm; **C:** RPN. **R:** Rutina.



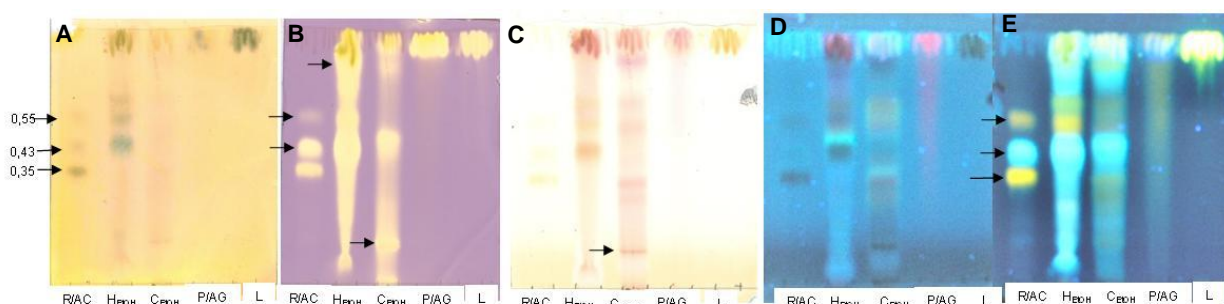
**Figura 127:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. parvifolia*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/metanol/agua (10:13,5:10). Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** Solución de  $FeCl_3$  al 10%; **C:** Rvo. de Borntrager, observación bajo luz UV 365nm; **D:** RPN. **R:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico; **AG:** Ácido gálico.



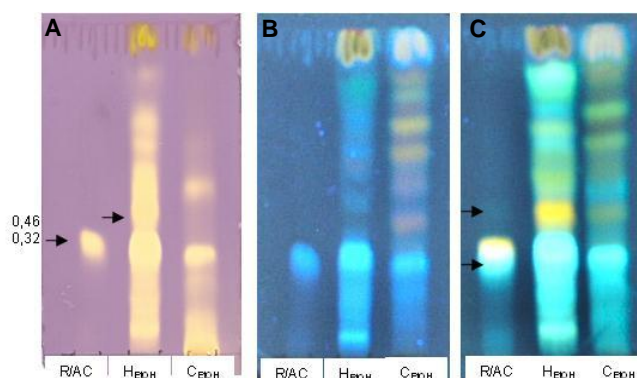
**Figura 128:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. parvifolia*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11:26). Reveladores: **A:** Solución de  $FeCl_3$  10%; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Observación bajo luz UV 365nm; **D:** RPN. **R:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico.

*Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de P. sellowii.*

Se evaluaron los extractos  $H_{EtOH}$  y  $C_{EtOH}$ , que fueron los más activos en el ensayo cuantitativo. Los dos extractos reaccionaron de forma rápida e intensa con el radical DPPH, casi con la misma intensidad que los controles positivos (patrones de referencia comerciales de rutina, ácido clorogénico, luteolina y ácido gálico). En la primer fase móvil utilizada (FM: acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua Fig.129) se observaron bandas de distinta polaridad e intensidad en el extracto  $H_{EtOH}$  y en el de  $C_{EtOH}$  (Fig.129B). En ambos extractos se observó la presencia de una banda de  $R_f = 0,43$  que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico (Fig.129B y E). En el extracto  $H_{EtOH}$ , la banda de  $R_f = 0,55$  que adquirió coloración amarilla/naranja al revelar la placa con RPN (Fig.129E) coincide en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de isoquercitrina; ambos compuestos, la isoquercitrina y el ácido clorogénico, presentan actividad antioxidante. Las restantes bandas con capacidad depuradora del radical DPPH presentaron características de revelado características de flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos (Wagner y Bladt, 2001). En el extracto  $C_{EtOH}$ , las bandas con actividad antioxidante de mayor polaridad, se correspondieron con antraquinonas, puesto que adquirieron coloración rojiza al revelar la placa con Rvo. de Börntrager (Fig. 129C y D), y con ácidos fenilcarboxílicos, que revelan de color azul/celeste al rociar la placa con RPN (Fig.129E). En la siguiente fase móvil (FM: cloroformo/ác. acético/metanol/ agua, Fig.130), se observó también mayor cantidad e intensidad de bandas correspondientes a compuestos antioxidantes en el extracto de hojas que en el de corteza. En el extracto  $C_{EtOH}$ , los bandas con actividad depuradora de radicales libres se correspondieron con ácidos fenilcarboxílicos (bandas de coloración azul/celeste con RPN); y en el extracto  $H_{EtOH}$ , se correspondieron con flavonoides y ácidos fenilcarboxílicos (Fig.130A y C). En ambos extractos se observó una banda de  $R_f = 0,32$  que coincidió con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico. Tanto el ácido clorogénico como la isoquercitrina serían, en parte, responsables de la actividad antioxidante de estos extractos.



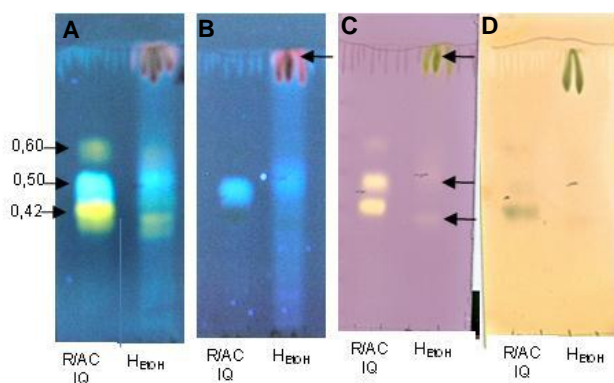
**Figura 129:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. sellowii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11:26). Reveladores: **A:** Solución de  $FeCl_3$  10%; **B:** Solución etanólica de DPPH; **C:** Rvo. de Börntrager, observación bajo luz visible; **D:** Rvo. de Börntrager, observación bajo luz UV 365nm; **E:** RPN. **R/AC:** Rutina, ácido clorogénico e isoquercitrina. **P/AG:** Fisión y ácido gálico; **L:** Luteolina



**Figura 130:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. sellowii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Cloroformo/ác. acético/metanol/agua (60:32:12:8). Reveladores: **A:** Solución etanólica de DPPH; **B:** Observación bajo luz UV 365nm; **C:** RPN. **R:/AC:** Rutina y ácido clorogénico;

*Análisis cualitativo de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos activos de P. crenata.*

Se evaluó cualitativamente el extracto  $H_{EtOH}$ , que fue el único extracto que mostró poseer una leve capacidad de depuración de radicales libres en el ensayo cuantitativo. Se observaron escasas bandas de baja intensidad con actividad antioxidante coincidiendo con los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo. Se cromatografió el extracto (FM: acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua, Fig.131), junto con los patrones de referencia comerciales de rutina, ácido clorogénico e isoquercitrina. Se observaron al menos tres bandas con actividad antioxidante (Fig.131C): una banda de  $R_f = 0,60$  que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de isoquercitrina, otra de  $R_f = 0,50$  que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial de ácido clorogénico y la tercer banda de  $R_f = 0,42$  que coincidió en  $R_f$  y coloración con patrón de referencia comercial de la rutina (Fig.131A y B). Estos compuestos se encontrarían en muy baja concentración en el extracto, y serían los responsables en parte de la débil actividad antioxidante del extracto.



**Figura 131:** Análisis cualitativo por CCD de la capacidad depuradora del radical DPPH de los extractos de *P. crenata*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (100:11:11:26). Reveladores: **A:** RPN, observación bajo luz UV 365nm; **B:** Observación bajo luz UV 365nm; **C:** Solución etanólica de DPPH; **D:** Solución de  $FeCl_3$  al 10%. **R:** Rutina; **AC:** Ácido clorogénico; **IQ:** Isoquercitrina.



*Discusión Breve de los Resultados.*

La cantidad e intensidad de las bandas correspondientes a compuestos con actividad depuradora del radical DPPH en cada extracto coinciden con los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo y en general se corresponden con compuestos de naturaleza polifenólica, principalmente taninos, ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides en todas las especies.

Para *A. altissima*, los extractos más activos fueron los de corteza diclorometano y corteza etanólico, donde las bandas con capacidad depuradora de DPPH se correspondieron con ácidos fenilcarboxílicos, y/o flavonoides.

Para *A. subovata* la actividad del extracto etanólico de hoja fue atribuida a flavonoides, entre ellos se comprobó la presencia de rutina al observar coincidencia en  $R_f$  y características de tinción entre una de las bandas presente en el extracto y la del patrón de referencia comercial de rutina en tres sistemas cromatográficos diferentes. En el extracto etanólico de corteza los compuestos con actividad antioxidante fueron caracterizados como polifenoles: taninos y flavonoides, entre estos últimos se detectó rutina.

Para *C. coccinea* la actividad depuradora de radicales libres fue atribuida a ácidos fenilcarboxílicos, taninos y flavonoides en el extracto etanólico de hojas, y sólo a ácidos fenilcarboxílicos en el etanólico de madera. Entre los flavonoides se observó la posible presencia de rutina y ácido clorogénico.

En los extractos de hoja de *C. tweedii* las bandas con actividad antioxidante se correspondieron, al igual que para *C. coccinea*, con compuestos polifenólicos, principalmente taninos, ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides, observándose la presencia de ácido clorogénico y rutina. En el extracto etanólico de madera la actividad se relacionó con ácidos fenilcarboxílicos.

Para *P. parvifolia* la actividad de los extractos etanólicos de hoja y corteza se atribuyó a ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides, con la posible presencia de ácido clorogénico en ambos extractos.

En *P. sellowii* los compuestos responsables de la actividad del extracto etanólico de corteza fueron ácidos fenilcarboxílicos, entre ellos ácido clorogénico, y en menor medida las antraquinonas. En el extracto etanólico de hojas, la actividad se correlacionó con ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides, entre ellos se observó la posible presencia de ácido clorogénico e isoquercitrina.

En *P. crenata*, en concordancia con la baja actividad registrada en los ensayos cuantitativos, las bandas con actividad antioxidante fueron pocas y de baja intensidad, y también se correspondieron con ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides, entre los cuales se observó la posible presencia de ácido clorogénico y rutina.

### 3- Actividad tripanocida

Existe probada evidencia de la actividad antiparasitaria, contra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria, de extractos de *C. coccinea* (Bourdy y col., 2004). Si bien la malaria posee baja incidencia en nuestro país, esta zona es endémica para el Mal de Chagas, otra enfermedad de origen parasitario causada por el *Trypanosoma cruzi*, por tal motivo se decidió evaluar la actividad antiparasitaria de los extractos de las especies en estudio en esta tesis comenzando por dicha especie y frente a epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados con concentraciones decrecientes de cada extracto en DMSO (1% de concentración final). Los resultados de inhibición del crecimiento del parásito y las concentraciones inhibitorias de cada extracto se expresan en la tabla 23; las concentraciones inhibitorias se obtuvieron graficando el porcentaje de inhibición en función de la concentración de cada extracto. La droga Benznidazol fue utilizada como control positivo y mostró una  $CI_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ .

Extractos	Concentración de los extractos ( $\mu\text{g/mL}$ )					$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	250	100	60	30	15	
Hoja <sub>DCM</sub>	70,00 $\pm$ 3,90	70,00 $\pm$ 3,78	51,00 $\pm$ 2,54	31,00 $\pm$ 1,89	0	67,06
Hoja <sub>EIOH</sub>	78,00 $\pm$ 4,56	69,00 $\pm$ 3,40	50,00 $\pm$ 2,15	28,00 $\pm$ 1,14	0	63,81
Corteza <sub>DCM</sub>	68,00 $\pm$ 2,85	51,00 $\pm$ 2,14	0	0	0	168,80
Corteza <sub>EIOH</sub>	48,00 $\pm$ 1,95	25,00 $\pm$ 1,74	0	0	0	220,35
Madera <sub>DCM</sub>	72,00 $\pm$ 3,88	60,00 $\pm$ 2,26	43,00 $\pm$ 2,03	37,00 $\pm$ 1,96	0	60,41
Madera <sub>EIOH</sub>	70,00 $\pm$ 2,95	62,00 $\pm$ 2,87	50,00 $\pm$ 2,33	29,00 $\pm$ 1,76	0	81,15

**Tabla 23:** Actividad tripanocida de los extractos de *C. coccinea*. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito (valor promedio y desvío estándar) y Concentración Inhibitoria del 50%.

Todos los extractos mostraron actividad a la mayor concentración ensayada (250  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo más activos los extractos de Hoja<sub>EIOH</sub> y Madera<sub>DCM</sub> seguidos por los de Hoja<sub>DCM</sub> y Madera<sub>EIOH</sub>. El extracto de Madera<sub>DCM</sub>, alcanzó altos porcentajes de inhibición aún a concentraciones bajas: 37% de inhibición a 30  $\mu\text{g/mL}$ , con una  $CI_{50}$  de 60,4  $\mu\text{g/mL}$ , mismo orden de magnitud que la registrada para el control positivo, Benznidazol.

En virtud de los buenos resultados obtenidos con los extractos de *C. coccinea*, y de los antecedentes sobre la actividad antiparasitaria reportada para distintas especies de esta Familia, se decidió continuar con la evaluación de la actividad tripanocida de los extractos de hoja, corteza y madera de las Simaroubaceas nativas. Se optó por ensayar una única concentración intermedia (Sülzen y col., 2007), a la cual todos los extractos de *C. coccinea* presentaron actividad (100  $\mu\text{g/mL}$ ), y se evaluaron solo los extractos diclorometánicos, puesto

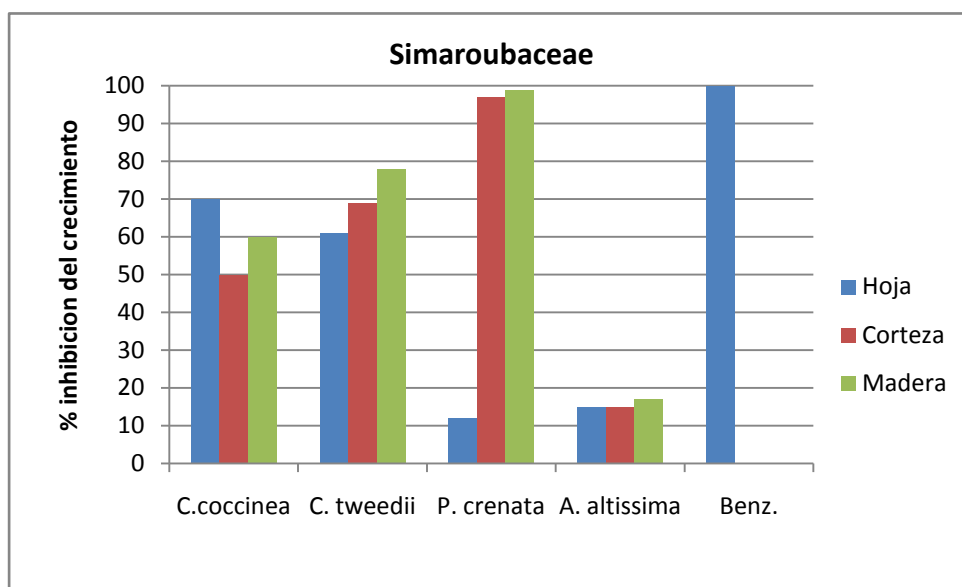
que estos resultaron levemente más activos que los etanólicos y presentan cierto grado de fraccionamiento en relación con los extractos etanólicos totales. En la tabla 24, se expresan los porcentajes de inhibición del crecimiento del parásito de los extractos diclorometánicos de las especies estudiadas.

<i>Extractos DCM</i>	<i>% Inhibición del crecimiento</i>
<i>A. subovata</i> Hoja	50±2,88
<i>A. subovata</i> Corteza	25±1,73
<i>A. subovata</i> Madera	80±4,61
<i>P. parvifolia</i> Hoja	35±1,86
<i>P. parvifolia</i> Corteza	14±0,76
<i>P. parvifolia</i> Madera	28±1,89
<i>P. sellowii</i> Hoja	35±2,04
<i>P. sellowii</i> Corteza	62±2,89
<i>P. sellowii</i> Madera	46±2,32
<i>C. coccinea</i> Hoja	70±3,78
<i>C. coccinea</i> Corteza	50±2,14
<i>C. coccinea</i> Madera	60±2,26
<i>C. tweedii</i> Hoja	61±2,64
<i>C. tweedii</i> Corteza	69±2,78
<i>C. tweedii</i> Madera	78,00±4,07
<i>P. crenata</i> Hoja	12,00±1,09
<i>P. crenata</i> Corteza	97,00±0,78
<i>P. crenata</i> Madera	99,1±0,65
<i>A. altissima</i> Hoja	15,00±1,23
<i>A. altissima</i> Corteza	15,00±2,05
<i>A. altissima</i> Madera	17,00±2,14
<i>Benznidazol</i>	100±

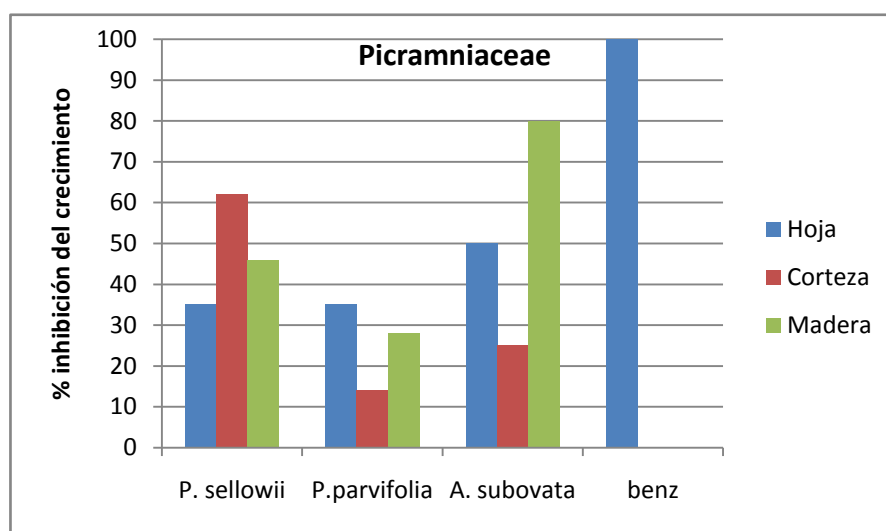
**Tabla 24:** Actividad tripanocida de los extractos diclorometánicos de Simaroubaceae nativas. Concentración de los extractos: 100µg/mL. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito (Valor promedio y desvío estándar)

Los extractos más activos fueron los de corteza y madera de *P. crenata*, que provocaron el 97 y 99% de inhibición del crecimiento del parásito respectivamente. El extracto de madera de *A. subovata* también presentó muy alta actividad tripanocida, alcanzando el 80% de inhibición. Los extractos de madera y hoja de *C. tweedii* y *C. coccinea* presentaron también actividad significativa, alcanzando el 78 y 70 % de inhibición respectivamente.

En general, los extractos de las especies pertenecientes a la subfamilia Simarouboideae fueron más activos que los correspondientes a las especies de Picramniaceae. Los primeros, a excepción de *A. altissima*, superaron siempre el 50 % de inhibición del crecimiento de los parásitos (Fig.132). Para las Picramniaceae solo los extractos de madera de *A. subovata* y hoja de *P. sellowii* superaron el 50% de inhibición (Fig. 133).



**Figura 132:** Actividad tripanocida de los extractos diclorometánicos de las especies nativas de la subfamilia Simarouboideae. Porcentaje de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* para cada extracto a concentración de: 100µg/mL, Benznidazol: control positiva.



**Figura 133:** Actividad tripanocida de los extractos diclorometánicos de las especies de Picramniaceae nativas. Porcentaje de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* para cada extracto a concentración de: 100µg/mL, Benznidazol: control positivo.



### *Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Castela tweedii*.*

*Castela tweedii* constituye una especie nativa de la provincia de Santa Fe, que habita en nuestra selva paranaense y de la cual no existen trabajos de investigación y/o publicaciones científicas que evalúen la potencial actividad biológica de sus extractos, como así tampoco sobre los constituyentes químicos de los mismos. Durante el transcurso de esta tesis, se observó que los extractos de *C. tweedii* poseen actividad antioxidante y tripanocida, por tales motivos se decidió continuar trabajando con los mismos en la búsqueda de actividad biológica que se encuentre relacionada con los usos tradicionales que presentan otras especies de la familia y la futura caracterización fitoquímica de los extractos que resulten activos.

#### *1.-Rendimiento de los extractos de *C. tweedii*.*

Se lograron mejores rendimientos a los obtenidos anteriormente (punto 1 de Resultados) realizando un nuevo procedimiento de extracción sucesivo (punto 4 de la sección Materiales y Métodos), mediante el cual, además del mayor rendimiento, hubo mejor aprovechamiento del material vegetal. Los nuevos rendimientos se expresan en la Tabla 25.

<i>Extracto 100µg/mL</i>	<i>Peso material de partida (g)</i>	<i>Peso extracto seco (g)</i>	<i>Rendimiento</i>
Hoja DCM	267	7,04	2,6%
Corteza DCM	216	3,46	1,6%
Madera DCM	402	2,87	0,72%
Hoja MeOH	267	47,4	17,8%
Corteza MeOH	216	12,5	5,8%
Madera MeOH	402	17,2	4,3%

**Tabla 25:** Rendimiento de los extractos de *C. tweedii*.

#### *2-Actividad tripanocida de los extractos de *C. tweedii*.*

Se completó el análisis de la actividad tripanocida de *C. tweedii* con la evaluación de la actividad de los extractos metanólicos frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*; siguiendo la misma metodología de trabajo que la utilizada para los extractos diclorometánicos. Los resultados se expresan en forma comparativa con los obtenidos para los extractos diclorometánicos en la Tabla 26.

<i>Extractos (100µg/mL)</i>	<i>% Inhibición del crecimiento</i>
Hoja DCM	61,00±2,64
Hoja MeOH	75,00±4,12
Corteza DCM	69,00±2,78
Corteza MeOH	53,00±2,25
Madera DCM	78,00±4,07
Madera MeOH	31,00±1,54

**Tabla 26:** Actividad tripanocida de los extractos de *C. tweedii*. Concentración de los extractos: 100µg/mL. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito (valor promedio y desvío estándar)

Todos los extractos presentaron actividad frente a *T. cruzi* a la concentración ensayada. Los extractos metanólicos resultaron menos activos que los respectivos diclorometánicos, salvo el extracto metanólico de hoja que superó el 70 % de inhibición del crecimiento del parásito y fue tan activo como el extracto diclorometánico de madera (75 y 78 % de inhibición respectivamente).

### 3-Actividad insecticida de los extractos de *C. tweedii*.

Mediante diferentes metodologías de laboratorio se evaluó la actividad insecticida de los extractos diclorometánicos y metanólicos de *C. tweedii* sobre *Ceratitis capitata*, plaga de gran importancia para la producción frutihortícola. Se utilizaron dos metodologías de ensayo en laboratorio para probar la eficacia de los extractos evaluando distintas vías de ingreso de los productos en el insecto: la vía oral, asociada a un ingreso por contacto e inhalación en los ensayos por exposición al alimento tratado (EAT) y la vía inhalatoria en la metodología por exposición en papel de filtro impregnado (EPFI).

#### 3.1-Ensayos por exposición a alimento tratado.

Esta metodología consiste en exponer las larvas neonatas a la dieta impregnada con los diferentes extractos, de esta forma se asegura que el producto ingrese al insecto por vía oral, por contacto e inhalación por hallarse las larvas expuestas directamente al producto durante todo su desarrollo. Se registraron efectos letales y subletales sobre las larvas expuestas a la dieta impregnada con los extractos metanólicos y diclorometánicos de hoja, corteza y madera.

##### 3.1.1-Efectos letales.

Los resultados de mortalidad pupal obtenidos se exponen en la Tabla 27:

<i>Mortalidad pupal total en %</i>				
<i>Extracto</i>		<i>Concentración</i>		
		5000 ppm 5mg/mL	500 ppm 0,5mg/mL	50 ppm 0,05mg/mL
<b>DCM</b>	Madera	33b	20a	17a
	Corteza	70c	60c	20a
	Hojas	100d	90d	45c
<b>MeOH</b>	Madera	73bc	53ab	20ab
	Corteza	95c	90c	60bc
	Hojas	90c	83c	73bc
<b>Controles</b>		0 a	0 a	0 a

**Tabla 27:** Porcentajes de mortalidad pupal total de *C. capitata* frente a los extractos diclorometánicos y metanólicos de *C. tweedii*. Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones ( $p \leq 0.05$ ).

El extracto metanólico de hojas fue el más efectivo a todas las concentraciones empleadas, inclusive mostró muy buena actividad a la concentración más baja empleada (0,05mg/mL). El extracto metanólico de corteza obtuvo respuesta significativa a todas las concentraciones ensayadas y el extracto metanólico de madera tuvo mortalidad significativa

solo a la mayor concentración empleada. Entre los extractos diclorometánicos, sólo el extracto de hojas mostró mortalidad significativa en todas las concentraciones ensayadas. El extracto diclorometánico de corteza presentó mortalidad significativa a 5mg/mL y 0,5mg/mL; y el extracto diclorometánico de madera solo leve actividad a 5mg/mL.

Se calculó la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), que es la cantidad de extracto necesario para matar el 50% de las larvas expuestas, de los extractos con mayor actividad, los resultados se expresan en la Tabla 28.

<i>Extracto</i>	<i>CE<sub>50</sub></i> ( $\mu$ g/mL)
Hoja DCM	62
Hoja MeOH	0,7
Corteza MeOH	19,2

**Tabla 28:** Concentración efectiva media de los extractos activos de *C. tweedii*.

Se considera que los extractos ensayados tienen un efecto insecticida promisorio dado que sus valores de  $CE_{50}$  son menores a 0,6mg/mL (Clemente, 2007), siendo muy efectivo el tratamiento con el extracto metanólico de hojas.

### 3.1.2-Efectos subletales.

Durante la exposición de las larvas por 25 días a una dieta artificial impregnada con cada extracto se fue registrando el progreso en cada etapa de la metamorfosis: formación de pupas y emergencia de adultos. Se obtuvo el tiempo de pupariación media ( $TP_{50}$ ) (Tabla 29), el cual indica la existencia de demoras en el desarrollo.

<i>Extractos</i> (5mg/mL)	<i>TP<sub>50</sub></i> (días)
Hoja DCM	7,9 (7,5-8,2)
Corteza DCM	-
Madera DCM	-
Control	10,5 (9,8-11)
Hoja MeOH	11,5 (10-19)
Corteza MeOH	8,6 (8-9,6)
Madera MeOH	8,5 (8,2-8,9)
Control	6 (4-7)

**Tabla 29:** Tiempos de pupariación medios de los extractos de *C. tweedii*.



Los extractos metanólicos mostraron alteraciones en el ciclo vital con demoras en el desarrollo de los insectos, siendo mayor en el tratamiento con el extracto metanólico de hojas, ya que se obtuvo un alargamiento de la etapa larval del 92% respecto del control.

Los extractos diclorometánicos mostraron distintas variaciones en el ciclo vital: el extracto diclorometánico de hojas registró una reducción del 20% del tiempo de pupariación medio en comparación con el control, mientras que en el extracto diclorometánico de corteza se evidenció una prolongación del 40% en el ciclo respecto al control, aunque no se pudo estimar el tiempo de pupariación medio por la gran dispersión de los resultados obtenidos. En el tratamiento con el extracto diclorometánico de madera no se registraron demoras en el desarrollo.

### 3.2-Ensayos por Inhalación.

Esta metodología consiste en exponer insectos adultos al producto a evaluar, el cual ingresará al mismo a través de la vía inhalatoria, dependiendo de la capacidad de volatilización que posean los compuestos presentes en los extractos. Se expusieron moscas adultas en cajas de Petri a los extractos impregnados en papel de filtro a una concentración fija de 0,5mg/mL y se realizaron observaciones cada hora durante las primeras 5 horas y luego a las 24hs. Los resultados de mortalidad obtenidos se expresan en la Tabla 30.

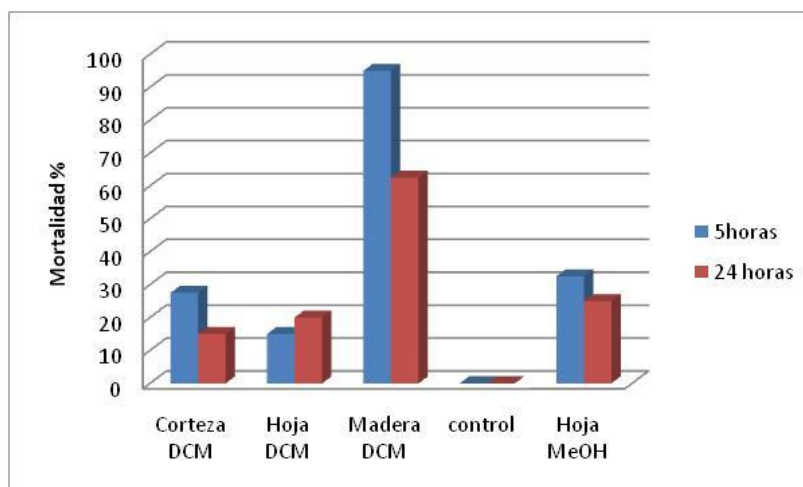
<i>Extracto</i>		<i>Mortalidad total (%)</i>	
		<i>5 horas</i>	<i>24 horas</i>
DCM	Hoja	15a	20a
	Corteza	27,5a	15a
	Madera	95b	62,5b
MeOH	Hoja	32,5a	25b
	Corteza	2,5a	7,5b
	Madera	3a	5a
	Control	0a	0a

**Tabla 30:** Mortalidad total de adultos de *C. capitata* tratadas con los extractos diclorometánicos y metanólicos de *C. tweedii* en ensayos por inhalación EPFI, concentración de los extractos: 0,5mg/mL. Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones ( $p \leq 0.05$ ).

Los extractos diclorometánicos fueron, en general, más activos que los metanólicos. El tratamiento con el extracto metanólico de hojas fue el único entre los extractos metanólicos, que produjo una mortalidad significativa del 25%. La mortalidad hallada en los tratamientos con los extractos metanólicos de corteza y madera no difirieron respecto del control.

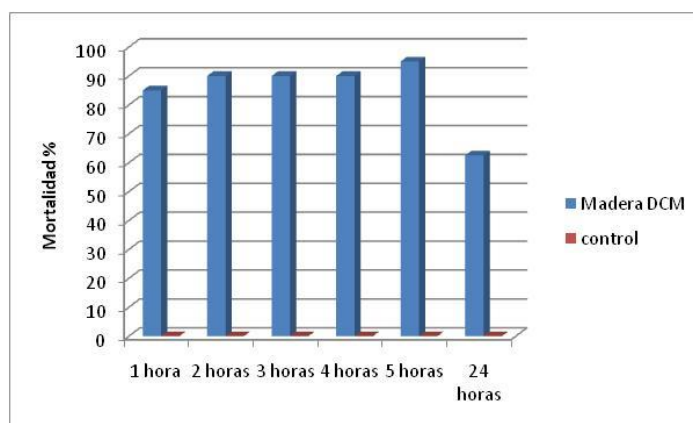
A las 5 horas de tratamiento, se obtuvo un 95% de mortalidad con el extracto diclorometánico de madera; tanto en este extracto como en el diclorometánico de corteza se

observó un efecto de volteo, que se pone de manifiesto en algunos individuos aparentemente muertos que se recuperan en las observaciones sucesivas (Figura 134).



**Figura 134:** Mortalidad total de adultos de *C. capitata* tratadas con extractos de *C. tweedii* a 0,5mg/mL en ensayos por inhalación EPFI.

El efecto de volteo causado por los extractos se hace más evidente en el tratamiento con el extracto diclorometánico de madera en el cual, ya a la hora de iniciado el tratamiento, se observó una mortalidad del 85 %, que revierte a 62,5% a las 24 horas de observación (Figura 135).



**Figura 135:** Mortalidad total de adultos de *C. capitata* tratadas con el extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* a 500ppm en ensayos por inhalación EPFI.

*Discusión Breve de los Resultados*

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica para los extractos de *C. tweedii* se resumen en forma comparativa en la Tabla 31.

<i>Extracto</i>	<i>Actividad tripanocida</i>	<i>Actividad insecticida</i>	
	% de inhibición del crecimiento	EPFI	EAT
<b>Hoja DCM</b>	<b>61%</b>	<b>15%</b>	<b>90%</b>
<b>Corteza DCM</b>	<b>69%</b>	<b>27,5%</b>	<b>60%</b>
<b>Madera DCM</b>	<b>78%</b>	<b>95%</b>	<b>-</b>
<b>Hoja MeOH</b>	<b>75%</b>	<b>32,5%</b>	<b>83%</b>
<b>Corteza MeOH</b>	<b>53%</b>	<b>2,5%</b>	<b>90%</b>
<b>Madera MeOH</b>	<b>31%</b>	<b>3%</b>	<b>53%</b>

**Tabla 31:** Valores obtenidos en los ensayos de actividad biológica realizados con extractos de *C. tweedii*; concentración de los extractos: actividad tripanocida: 100µg/mL; actividad insecticida: 0,5mg/mL; EPFI a las 5 horas de ensayo.

Los extractos de *C. tweedii* demostraron poseer distintas actividades biológicas, algunos de ellos de importante efectividad, tal es el caso del extracto diclorometánico de madera que provocó el 78% de inhibición del crecimiento del parásito *T. cruzi* in vitro y un 95% de mortalidad de moscas adultas de *C. capitata* en los ensayos por inhalación (EPFI). El siguiente extracto que mostró tener considerable actividad biológica fue el metanólico de hojas, que posee alto porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. cruzi* (75%) y elevada actividad insecticida, provocando un 90% de mortalidad pupal en los ensayos de ingestión del alimento tratado (EAT). Debido a que no existen trabajos científicos publicados que reporten la composición química de extractos de *C. tweedii* surgió la necesidad de realizar una caracterización fitoquímica de estos extractos activos.

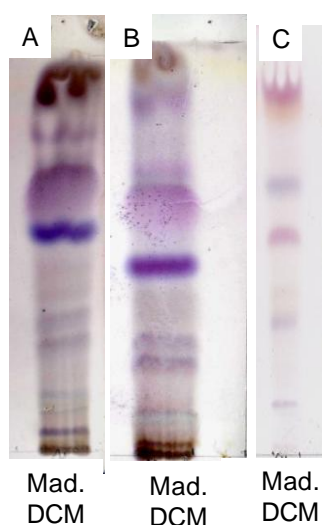
### Caracterización fitoquímica de los extractos activos de *Castela tweedii*.

*C. tweedii* es una especie autóctona de la provincia de Santa Fe de la cual no existen, hasta el momento, reportes publicados sobre sus propiedades biológicas y de la composición química de sus extractos. Por tales motivos, se realizó una caracterización fitoquímica de los extractos que presentaron actividad biológica promisorio en los distintos ensayos realizados (actividad antioxidante, tripanocida e insecticida).

#### 1- Caracterización fitoquímica del extracto diclorometánico de madera.

El extracto diclorometánico de madera fue seleccionado para su caracterización fitoquímica debido a que fue el que presentó mayor actividad insecticida en el ensayo de exposición en papel de filtro impregnado. En este ensayo se evaluó el efecto inhalatorio de dicho extracto sobre insectos adultos de *Ceratitis capitata*, el cual provocó un 95% de mortalidad de los mismos a las 5 horas de ensayo. Además, en los ensayos de actividad tripanocida este extracto fue uno de los más activos, provocando un 78% de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

El perfil cromatográfico del extracto, obtenido por cromatografía en capa delgada (CCD), mostró preponderancia de bandas de coloración azul/violácea al revelar la placa con el reactivo anisaldehído sulfúrico (AS) (Fig. 136). Los triterpenos y derivados triterpénicos en general poseen dichas características de coloración cuando se utiliza AS como revelador (Wagner y Bladt, 2001). Algunas de estas bandas podrían corresponder a los cuasinoides, metabolitos de naturaleza triterpénica característicos de la familia Simaroubaceae (Okano y col., 2000).

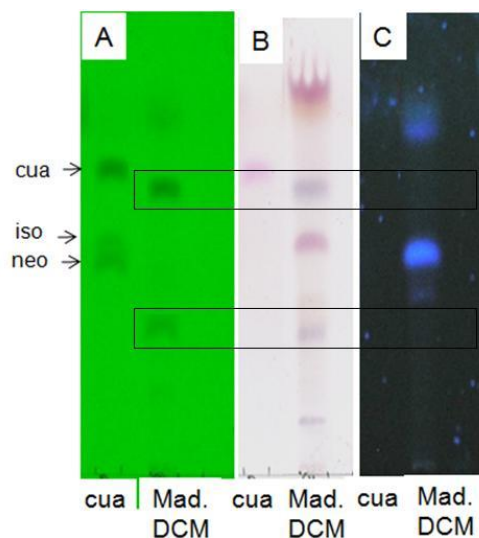


**Figura 136:** CCD del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. **FE:** Silica gel. **A:** FM: Tolueno/acetato de etilo (7:3); **B:** FM: Tolueno/éter (7:3); **C:** FM: Cloroformo/metanol (9:1). Revelador: AS.

Por tal motivo, se cromatografió el extracto frente a patrones de referencia comerciales de cuasinoides, en este caso una mezcla de cuasina, neo e isocuasina, los dos últimos en menor proporción. Como se observa en la figura 137, la banda correspondiente al patrón de

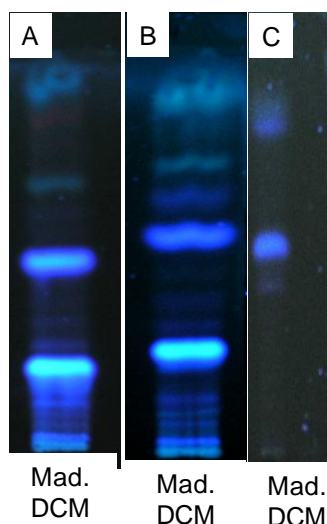


referencia comercial, cuasina, revela de color violáceo con AS, extingue la fluorescencia bajo luz UV de 254nm y no presenta fluorescencia bajo luz UV de 365nm. En el extracto se observan al menos dos bandas con estas mismas características, aunque ninguna de ellas correspondió a cuasina, iso o neocuasina (Fig. 137).



**Figura 137:** CCD del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* frente a patrones de referencia comercial de cuasinoídes. **FE:** Silica gel. **FM:** Cloroformo/metanol (9:1). **A:** Observación bajo luz UV de 254nm; **B:** Placa revelada con AS; **C:** Observación bajo luz UV de 365nm. **cua:** Mezcla de patrones de referencia comercial, cuasina, isocuasina y neocuasina.

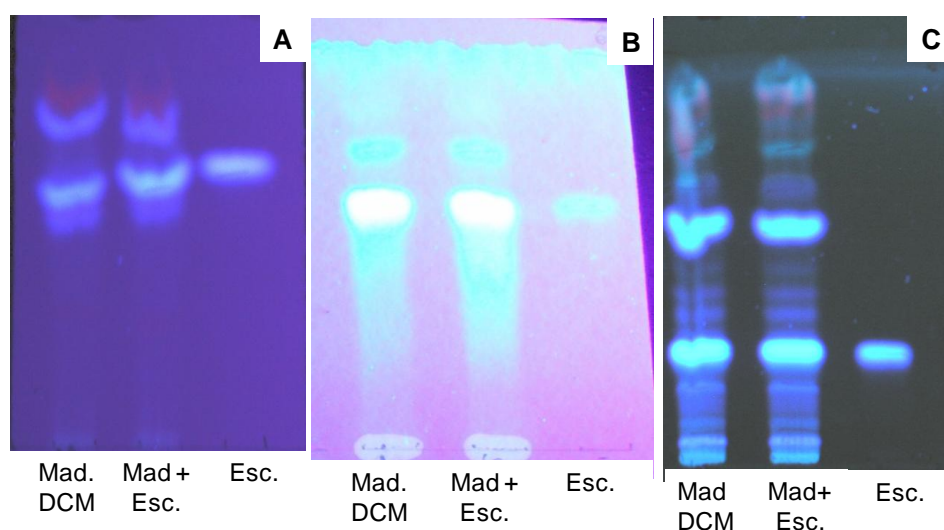
Cuando se utiliza como revelador el reactivo de productos naturales (RPN) se observan bandas de coloración celeste bajo luz UV de 365nm, pudiendo tratarse de cumarinas y ácidos fenilcarboxílicos (Fig. 138).



**Figura 138:** CCD del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. **FE:** Silica gel. **A:** **FM:** Tolueno/éter (7:3); **B:** **FM:** Tolueno/acetato de etilo (7:3); **C:** **FM:** Diclorometano/metanol (9:1). Revelador: RPN, observación bajo luz UV de 365nm.

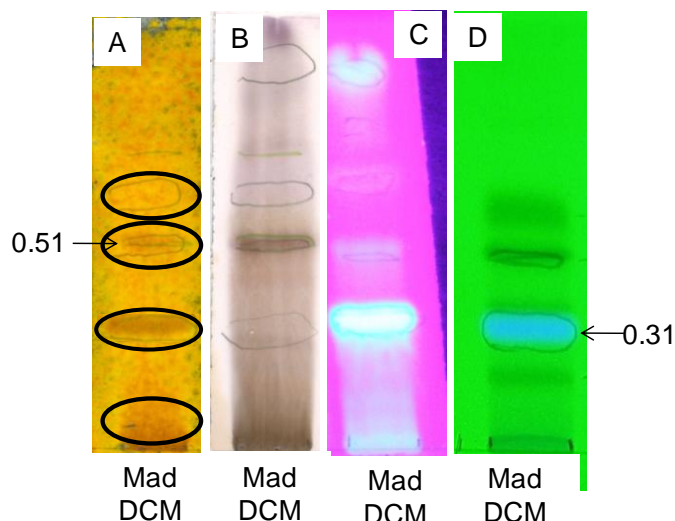
A continuación, se cromatografiaron el extracto, frente a patrones comerciales de cumarinas y el extracto co-sembrado junto con dichos patrones en tres sistemas diferentes (Fig. 139). Se utilizaron como patrones de referencia comerciales escopoletina (Fig. 139) y umbeliferona. Se identificó cromatográficamente escopoletina en el extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* al observar, en los tres sistemas cromatográficos utilizados, coincidencia

de relación de frente (Rf) y coloración entre la banda correspondiente al patrón de referencia comercial escopoletina y una de las bandas presente en el extracto (Fig.139). No se detectó umbeliferona.



**Figura 139:** CCD del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* frente a escopoletina. **A:** **FE:** Silica gel, **FM:** Tolueno/acetato de etilo (7:3), observación bajo luz UV 365nm. **B:** **FE:** Celulosa, **FM:** Ácido acético 6%, revelado con RPN. **C:** **FE:** Silica gel, **FM:** Cloroformo/metanol (9:1), observación bajo luz UV 365nm. **Mad DCM:** Extracto diclorometánico de madera; **Esc:** Patrón de referencia comercial de escopoletina.

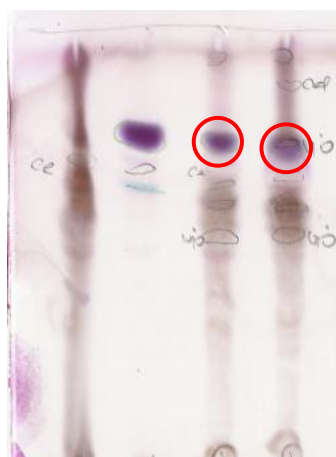
Finalmente, se realizó una CCD utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff, a fin de caracterizar la presencia de alcaloides en el extracto. Se observó la presencia de al menos tres bandas que dieron reacción positiva con este reactivo (Fig. 140A). Existen reportes de la presencia de alcaloides del tipo  $\beta$ -carbonílico para especies de esta familia (Varga y col., 1980; Readell y col., 2003; Rivero-Cruz y col., 2005). Este tipo de alcaloides revela positivamente con Dragendorff, posee fluorescencia celeste bajo luz UV de 365nm y extingue la fluorescencia bajo luz UV de 254nm (Wagner y Bladt, 2001). Estas características fueron observadas en las bandas de Rf 0.31 y 0.51. Las cumarinas pueden dar reacción positiva con Dragendorff, por lo tanto dichas bandas podrían deberse tanto a la presencia de alcaloides como de cumarinas en el extracto.



**Figura 140:** CCD del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Tolueno / éter (1:1). **A:** Revelado con reactivo de Dragendorff; **B:** Revelado con AS; **C:** Observación bajo luz UV de 365nm; **D:** Observación bajo luz UV de 254nm.

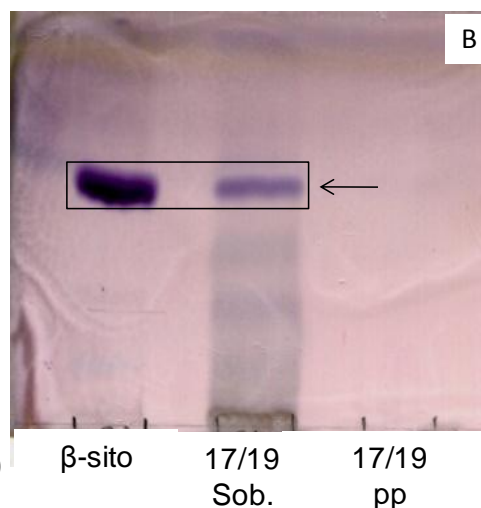
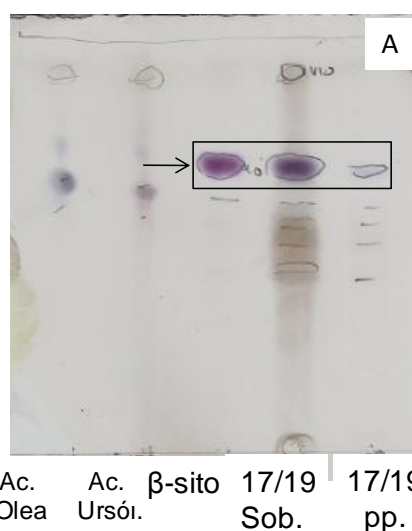
Este extracto diclorometánico de madera activo se fraccionó por cromatografía en columna de sílica gel a presión hidrostática; las condiciones cromatográficas se detallan en la sección Materiales y Métodos. Se obtuvieron 60 fracciones que fueron evaluadas por CCD. Las fracciones que presentaron perfiles cromatográficos similares fueron reunidas, dando 15 fracciones finales enumeradas: fracción 1, 2, 3, 4/5, 6/11, 12/13, 14, 15/16, 17/19, 20/25, 26/29, 30/33, 34/48, 49/60 y 61/62.

En los perfiles cromatográficos por CCD, se observó la presencia de un compuesto mayoritario en las fracciones 17/19 y 20/25. Al sembrar dichas fracciones frente a los patrones de referencia comerciales ácido ursólico, ácido oleanólico y  $\beta$ -sitosterol, se observó coincidencia en  $R_f$  y coloración violácea entre el patrón de referencia comercial  $\beta$ -sitosterol y la banda correspondiente al compuesto mayoritario en estas fracciones (Fig.141). Ambas fracciones, 17/19 y 20/25, presentaron un precipitado de color blanco que fue separado por centrifugación. El precipitado y el sobrenadante de la fracción 17/19, fueron cromatografiados junto con el patrón de referencia comercial  $\beta$ -sitosterol, en tres sistemas cromatográficos diferentes. Se determinó la presencia de  $\beta$ -sitosterol al observarse coincidencia de  $R_f$  y coloración entre la banda correspondiente al patrón de referencia comercial y una de las bandas presentes en el sobrenadante de la fracción 17/19 en los tres sistemas (Fig. 142).



Mad β-sito 17/19 20/25  
DCM

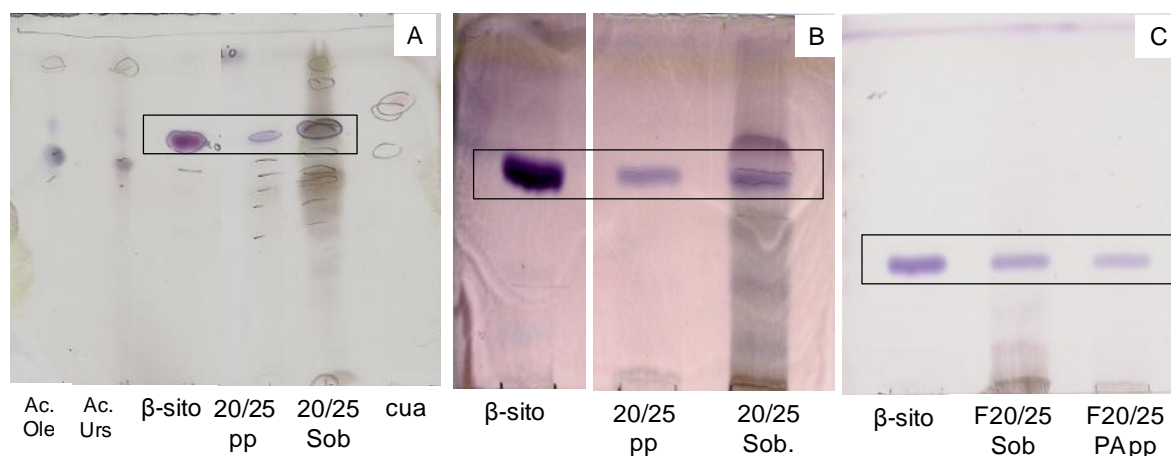
**Figura 141:** CCD del extracto diclorometánico de madera y las fracciones 17/19 y 20/25 junto con el patrón de referencia comercial de  $\beta$  sitosterol. **FE:** Sílica gel; **FM:** Diclorometano/metanol (9:1); revelado con AS. **β-sito:** Patrón de referencia comercial de  $\beta$ - sitosterol



**Figura 142:** CCD de la fracción 17/19 junto con patrones de referencia comerciales. **FE:** Sílica gel. **A: FM:** Diclorometano/metanol (9:1) revelado con AS. **B: FM:** Benceno/acetato de etilo (7:3), revelado con AS. **Ac olea:** Patrón de referencia comercial de ácido oleanólico; **Ac. Ursol.:** Patrón de referencia comercial de ácido ursólico; **β-sito:** Patrón de referencia comercial de  $\beta$  sitosterol; **17/19 sob.:** Sobrenadante de fracción 17/19; **17/19 pp:** Precipitado de fracción 17/19.

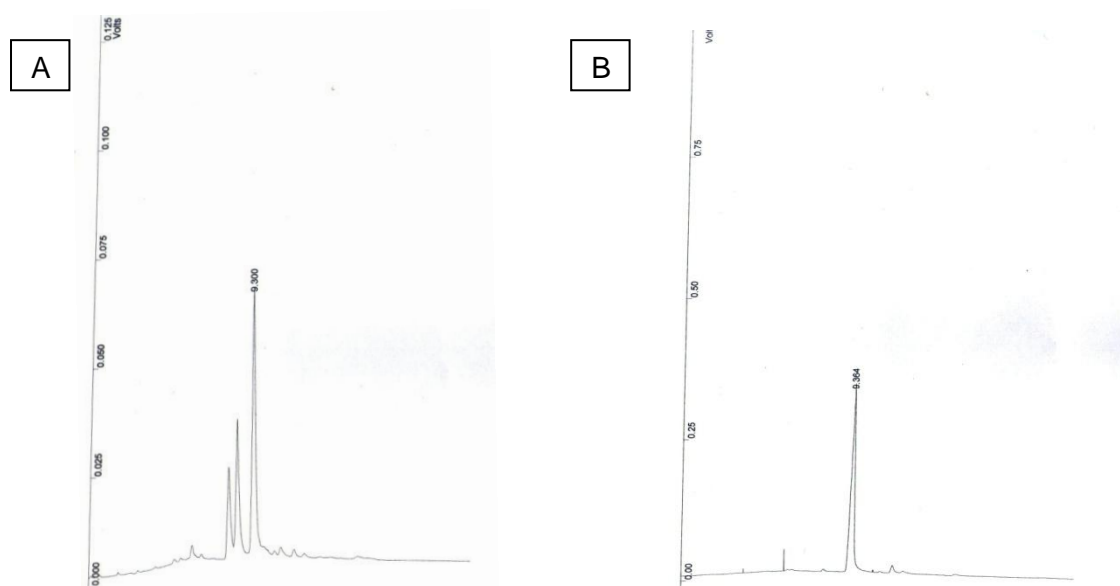
El precipitado y el sobrenadante de la fracción 20/25 también fueron cromatografiados junto con los patrones de referencia comerciales de ácido ursólico, ácido oleanólico y  $\beta$ -sitosterol. Se identificó cromatográficamente  $\beta$ -sitosterol en esta fracción por coincidencia de  $R_f$  y coloración entre una de las bandas y el patrón de referencia en tres sistemas cromatográficos diferentes (Fig. 143).





**Figura 143:** CCD fracción 20/25 junto a patrones de referencia comerciales. **FE:** Sílica gel. **A:** **FM:** Diclorometano/metanol (9:1); **B:** **FM:** Benceno/acetato de etilo (7:3); **C:** **FM:** Hexano/éter etílico (1:1), reveladas con AS. **Ac. Ole.:** Patrón de referencia comercial de ácido oleanólico; **Ac. Urs.:** Patrón de referencia comercial de ácido ursólico; **β-Sito.:** Patrón de referencia comercial de β-sitosterol; **20/25 pp:** Precipitado de fracción 20/25; **20/25 sob.:** Sobrenadante de fracción 20/25; **cua:** Patrón de referencia comercial de cuasina.

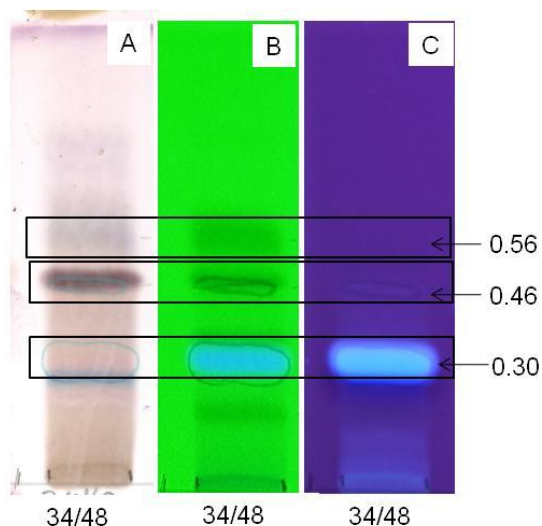
Se confirmó la presencia de β-sitosterol en el precipitado de la fracción 20/25 por cromatografía en fase gaseosa al coincidir el tr del pico mayoritario en el precipitado de la fracción (tr: 9,3 min.) y el pico correspondiente al patrón de referencia comercial (tr: 9,3 min.) (Fig. 144 A y B).



**Figura 144:** Cromatogramas obtenidos por CG. **A:** Precipitado de la fracción 20/25; **B:** Patrón de referencia comercial de β-sitosterol.

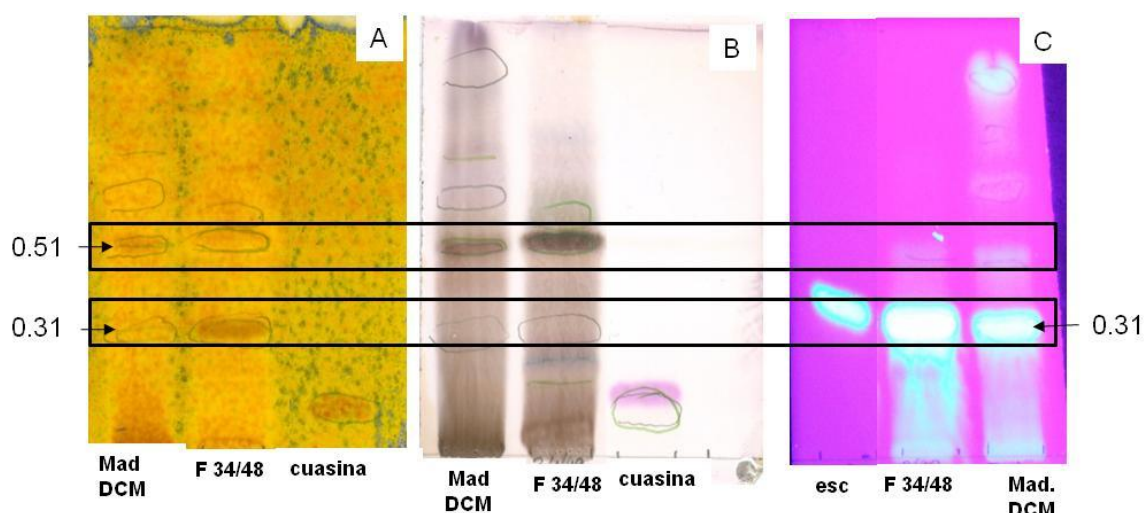
La fracción 34/48 (Fig. 145) presentó, en el primer sistema cromatográfico utilizado (tolueno/éter (1:1)), tres bandas mayoritarias: una de Rf 0.30 y coloración celeste bajo luz UV que no revela con AS, otra de Rf 0.46 que reveló de color marrón con AS y presentó

fluorescencia celeste bajo luz UV de 254 y de 365nm (Fig. 145), y una tercera banda de Rf: 0.56 que adquirió coloración azul violácea al revelar con AS, extinguió la fluorescencia bajo luz UV de 254nm y no presentó fluorescencia bajo luz UV de 365nm. Por las características de revelado presentadas, la banda de Rf: 0.30 podría corresponder a una cumarina, y la de Rf: 0.56 a un triterpeno o cuasinoide.



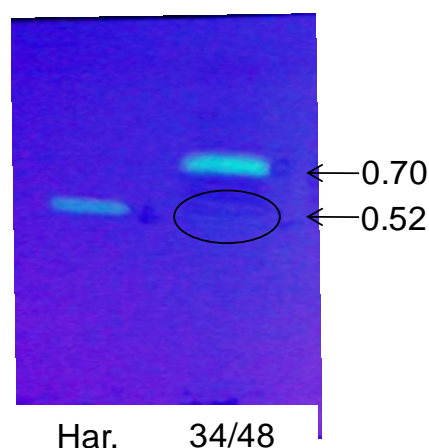
**Figura 145: CCD de la fracción 34/48.** FE: Sílica gel, FM: Tolueno/éter (1:1). **A:** Revelada con AS; **B:** Observación bajo luz UV de 254nm; **C:** Observación bajo luz UV de 365nm.

La fracción 34/48 fue cromatografiada junto a los patrones de referencia comerciales escopoletina y cuasina (Fig. 146). La banda de Rf: 0.31 coincidió en Rf y coloración con el patrón de referencia comercial escopoletina. La banda de Rf: 0.51 por sus características de revelado, reacción positiva con Rvo. de Dragendorff, y de fluorescencia podría corresponder a un alcaloide.



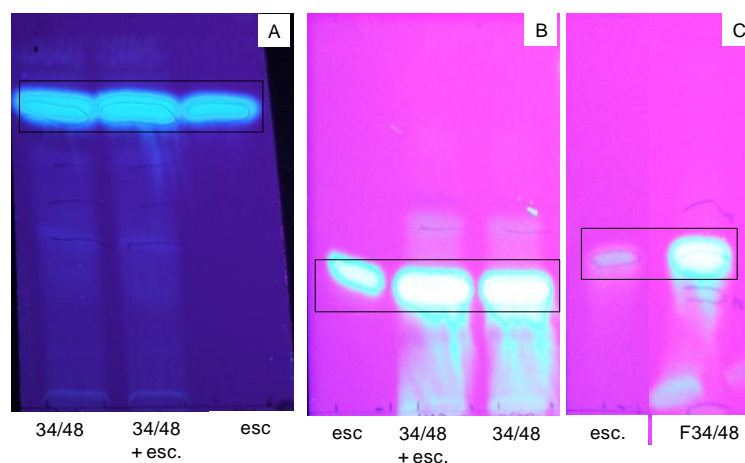
**Figura 146:** CCD de la fracción 34/48 junto con patrones de referencia comerciales. **FE:** Sílica gel, **FM:** Tolueno/éter (1:1). **A:** Revelado con Reactivo de Dragendorff; **B:** Revelado con AS; **C:** Observación bajo luz UV de 365nm. **Mad DCM:** Extracto diclorometánico de madera; **F34/48:** Fracción 34/48; **cua:** Patrón de referencia comercial de cuasina; **esc:** Patrón de referencia comercial de escopoletina.

Existen trabajos publicados que reportan la presencia de alcaloides del tipo  $\beta$ -carbonílico en especies de la familia Simaroubaceae. Por tal motivo se cromatografió la fracción 34/48 junto con un patrón de referencia comercial de este tipo de alcaloides: el harmano. Se observó una banda de baja intensidad de fluorescencia que coincidió en  $R_f$  y coloración con el patrón de referencia comercial (Fig. 147), sin embargo, la presencia de esta banda no pudo detectarse en un nuevo sistema cromatográfico.



**Figura 147:** CCD de la fracción 37/48 junto con el patrón de referencia comercial harmano. **FE:** Sílica gel, **FM:** Diclorometano/metanol (9:1), observación bajo luz UV de 365nm. **Har:** Patrón de referencia comercial de harmano.

Se identificó cromatográficamente escopoletina en esta fracción por coincidencia de  $R_f$  y coloración entre la banda correspondiente al patrón de referencia comercial y una de las bandas presentes en la fracción, en tres sistemas cromatográficos diferentes (Fig. 148).



**Figura 149:** CCD de la fracción 34/48 junto con el patrón de referencia comercial escopoletina. **FE:** Sílica gel. **A: FM:** cloroformo/metanol (9:1), observación bajo luz UV de 365 nm; **B: FM:** Tolueno/eter (1:1) revelado con RPN; **C: FM:** Tolueno/acetato de etilo (1:1), revelado con RPN. **34/48:** Fracción 34/48; **34/48 +esc.:** Co-cromatografía de la fracción con escopoletina. **Esc.:** Patrón de referencia comercial de escopoletina.

También se detectó escopoletina, por coincidencia de  $R_f$  y coloración en CCD, en la fracción siguiente 49/60.

Con el fin de corroborar la caracterización realizada en la fracción 34/48 por CCD de las bandas que corresponderían a cuasinoides (Fig. 145), cumarinas y/o alcaloides (Fig. 146), se analizó dicha fracción por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) acoplada con detector UV con arreglo de fotoiodos (UV/DAD). La caracterización de dichos compuestos se realizó por comparación de sus tr y/o espectros UV con los de los patrones de referencia comercial indicados en la sección 5.3 del capítulo Materiales y Métodos. El perfil cromatográfico de la fracción 34/48 es el presentado en la figura 149.

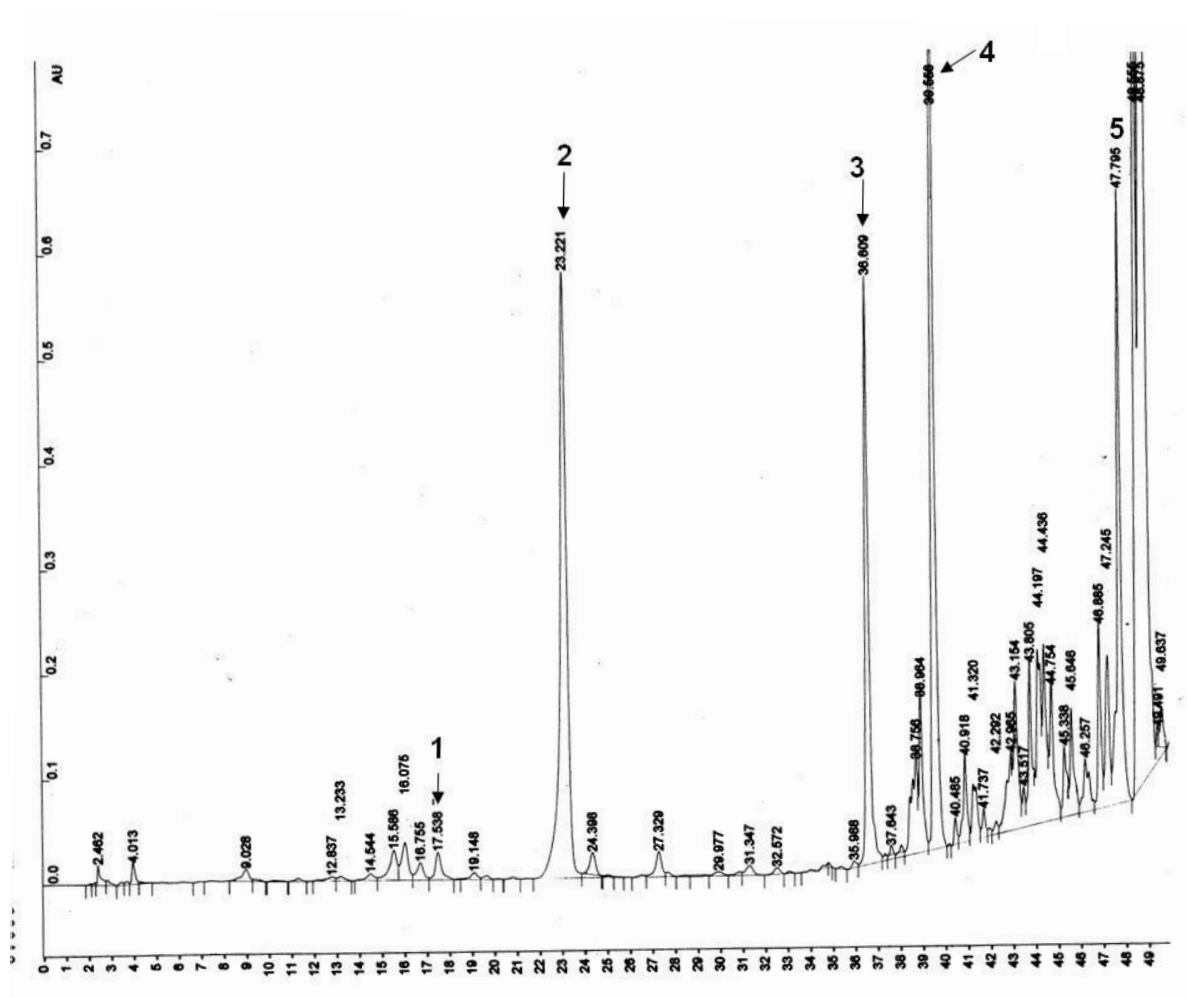
El pico (1) de tr de aproximadamente (aprox.) 17,5 min. (Fig. 149), correspondió a un compuesto cuyo espectro UV es muy similar al del alcaloide harmano, con dos  $\lambda_{\max}$ : uno a 240 y otro 290 nm, sugiriendo la presencia de un alcaloide con el mismo cromóforo que el harmano: el núcleo  $\beta$ -carbonílico (Sanchez y Comin, 1971) (Fig. 150).

El pico (2) de tr aprox. 23,2 min coincide en tr y espectro UV con el patrón de referencia comercial de escopoletina, confirmando la presencia de esta cumarina en la fracción (Fig. 151).

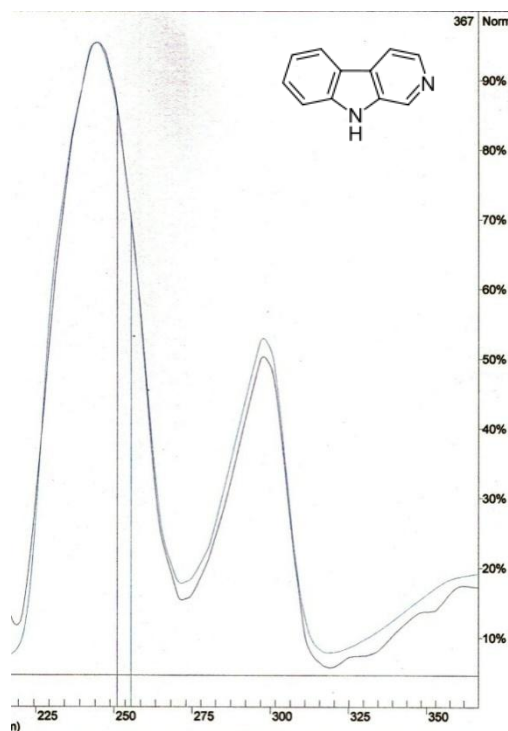
Los picos (3) y (4), de tr aprox. 36,6 y 39,5 min. respectivamente, poseen espectros similares, característicos de cumarinas. Las cumarinas simples absorben alrededor de los 264 y 311 nm debido a los anillos bencénicos y  $\alpha$ -pirona respectivamente y presentan variaciones según sus sustituyentes; por ejemplo, en las cumarinas que presentan sustituciones



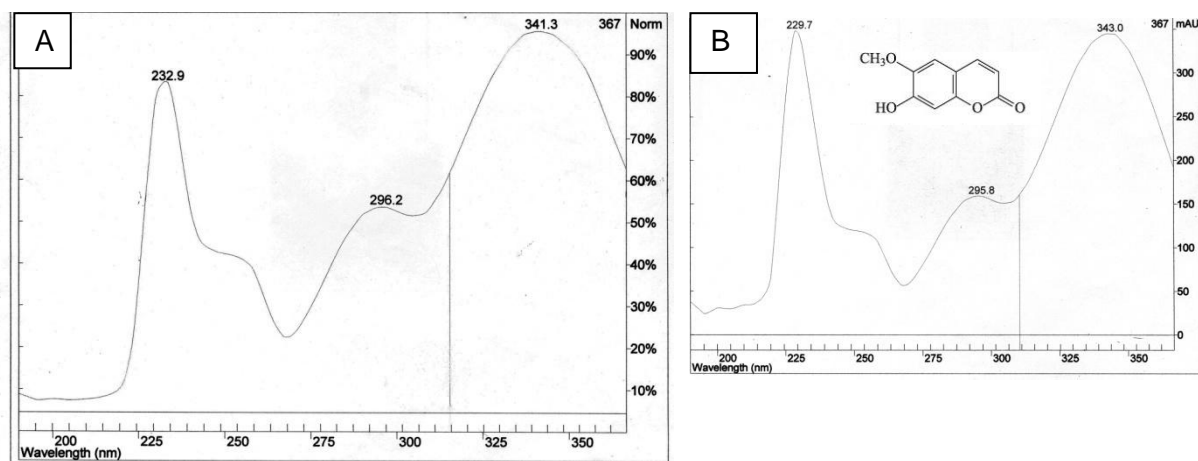
oxigenadas en C-7 la banda correspondiente a la  $\alpha$ -pirona sufre un efecto batocrómico, tal como ocurre en estos picos (Soine, 1964; Murray y col., 1982; Lock de Ugaz, 1994) (Fig. 152).



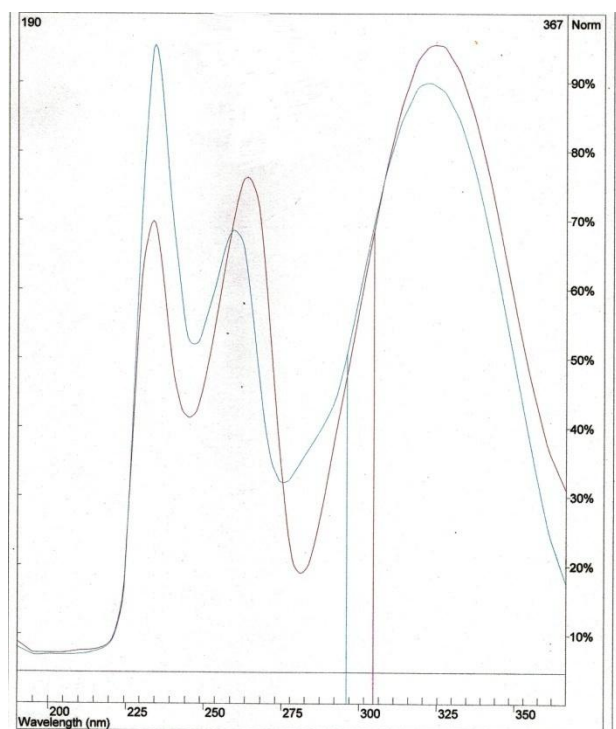
**Figura 149:** Perfil cromatográfico de la fracción 34/48 del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* obtenido por CLAE en el sistema cromatográfico I.



**Figura 150:** Espectro UV correspondiente al pico (1) de tr aprox. 17,5 min. superpuesto al espectro UV del patrón de referencia comercial de harmano.



**Figura 151:** **A:** Espectro UV correspondiente al pico (2) tr aprox. 23,2 min. del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. **B:** Espectro correspondiente al patrón de referencia comercial escopoletina.



**Figura 152:** Espectros UV correspondientes a los picos (3), tr aprox. 36,6 min. y (4), tr aprox. 39,5 min. de la fracción 34/48 del extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*.

*Discusión Breve: Caracterización fitoquímica del extracto diclorometánico de madera.*

Mediante la combinación de distintas técnicas cromatográficas, cromatografía en columna, CG, CCD y CLAE acoplada con detector UV/DAD, se separaron y caracterizaron los compuestos presentes en el extracto diclorometánico de madera, que fue activo frente a *Ceratitis capitata* y *Tripanosoma cruzi*.

Se identificó cromatográficamente  $\beta$ -sitosterol mediante CCD por coincidencia de Rf y coloración con el patrón de referencia comercial en tres sistemas cromatográficos diferentes, y por CG por coincidencia del tr con el del patrón de referencia comercial. Este es el primer informe de la presencia de  $\beta$ -sitosterol en extractos de *C. tweedii*.

La presencia de la cumarina escopoletina fue confirmada por dos métodos: mediante CCD por coincidencia de Rf y coloración con el patrón de referencia comercial en tres sistemas cromatograficos diferentes, y mediante CLAE acoplada a espectroscopia UV al coincidir tr y espectro UV con los del patrón de referencia comercial. Este es el primer reporte de la presencia de esta cumarina en extractos de *C. tweedii*.

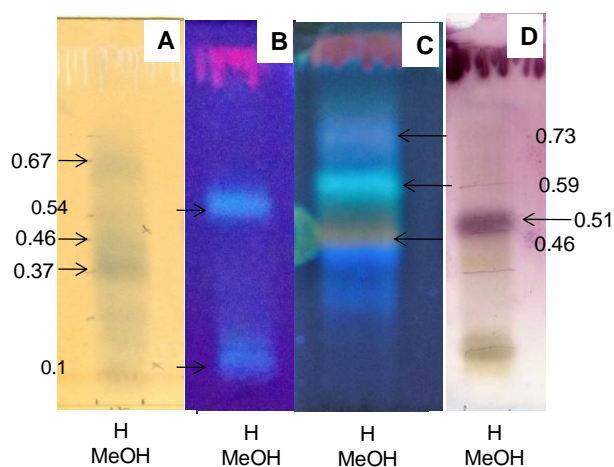
Se caracterizaron otras cumarinas y alcaloides del tipo  $\beta$ -carbonílicos mediante CCD y CLAE en el extracto, por similitud de las características de revelado y de espectros UV con los patrones de referencia comercial.

## 2- Caracterización fitoquímica del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*

El extracto metanólico de hojas presentó actividad tripanocida, provocando un 75% de inhibición del crecimiento de los parásitos. Además, provocó el mayor porcentaje de mortalidad de moscas adultas en los ensayos de ingestión de alimento tratado (83%). Por tales motivos se realizó una caracterización de los compuestos presentes en el extracto.

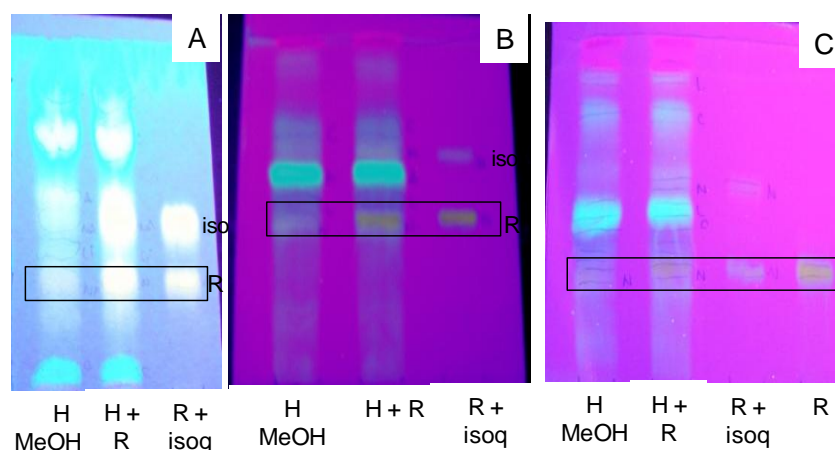
En el análisis por CCD se utilizaron distintos sistemas cromatográficos y reveladores. Bajo luz UV de 365nm se observaron bandas de coloración celeste de Rf: 0.54 y 0.1 (Fig. 153B). Al revelar la placa con RPN (Fig. 153C) se observaron bandas de fluorescencia naranja, de Rf: 0.46 y 0.73 y una banda de coloración celeste verdosa de Rf: 0.59, dichas bandas revelaron de color gris oscuro cuando se roció la placa con una solución acuosa de cloruro férrico, lo que nos estaría indicando la presencia de compuestos polifenólicos en el extracto (Fig.153A). Al revelar la placa con AS se evidenció al menos una banda de coloración violácea, pudiendo tratarse de un derivado triterpénico (Fig. 153D).

Se identificó cromatográficamente rutina en el extracto metanólico de hoja al sembrar, en tres sistemas diferentes, el extracto junto con el patrón de referencia y al observarse en los tres casos coincidencia en Rf y color entre el patrón y una de las bandas del extracto (Fig. 154). No se detectó escopoletina ni umbeliferona en este extracto.



**Figura 153:** CCD del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*. **FE:** Sílica gel. **FM:** Acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/agua (10:1.1:1.1:2.6). **A:** Revelado con solución de cloruro férrico al 10%; **B:** Observación bajo luz UV de 365nm; **C:** Revelado con RNP; **D:** Revelado con AS.





**Figura 154:** CCD del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii* frente a los patrones de referencia comercial rutina e isoquercitrina. **A:** FE: Celulosa, FM: Ác. acético 6%, revelado con RPN. **B:** FE: Sílica gel, FM: Acetato de etilo/ác. acético/ác. fórmico/agua (10:1,1:1,1:2,6), revelado con RPN. **C:** FE: Sílica gel, FM: Formiato de etilo/tolueno /ác. fórmico/ agua (6:2:2:1), revelado con RPN. **R:** Patrón de referencia comercial de rutina; **R+isop:** Patrón de referencia comercial de rutina e isoquercitrina.

Por último, se sembró el extracto junto con patrones de referencial comercial de cuasinoides: cuasina, iso y neocuasina. Al revelar la placa con AS se observaron bandas de coloración y fluorescencia características de los cuasinoides, pero ninguna de ellas coincidió en Rf con las de los patrones de referencia utilizados (Fig. 155).



**Figura 155:** CCD del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii* con patrones de referencia comerciales. FE: Sílica gel. FM: Cloroformo/metanol (9:1). **A:** Revelado con AS. **esc:** Patrón de referencia comercial de escopoletina. **cua:** Patrón de referencia comercial de cuasina, iso y neocuasina.

Para continuar con la caracterización de los compuestos presentes en este extracto activo se realizó un fraccionamiento líquido-líquido con acetato de etilo, obteniéndose dos fracciones: fracción metanólica-acetato de etilo ( $H_{AcOEt}$ ) y fracción metanólica-acuosa ( $H_{acuoso}$ ). Ambas fracciones fueron analizadas por CLAE acoplada a un detector UV/DAD. La identidad

de los compuestos se corroboró mediante el tiempo de retención ( $t_r$ ) y el análisis de sus espectros UV obtenidos con el detector UV/DAD; se utilizaron los patrones de referencia comerciales y las condiciones cromatográficas indicadas en la sección 5.4 de Materiales y Métodos.

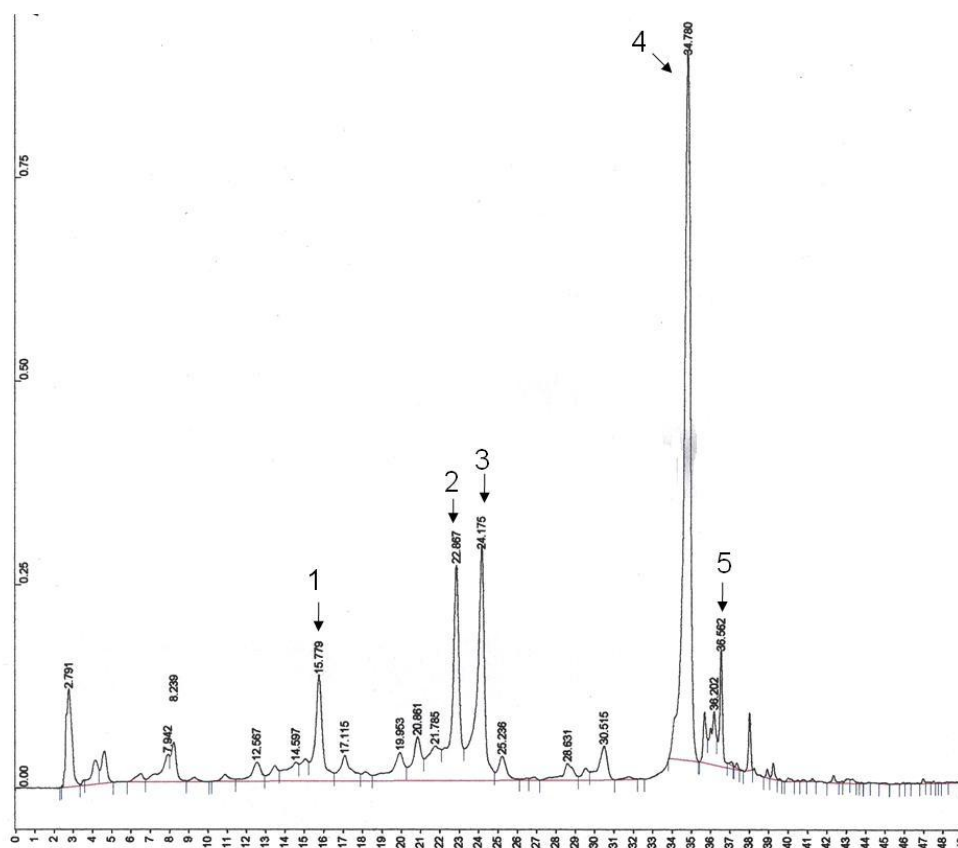
### *2.1-Análisis por CLAE de la fracción $H_{AcOEt}$ .*

El perfil cromatográfico de la fracción  $H_{AcOEt}$  obtenido por CLAE con el sistema cromatográfico I, se presenta en la figura 156.

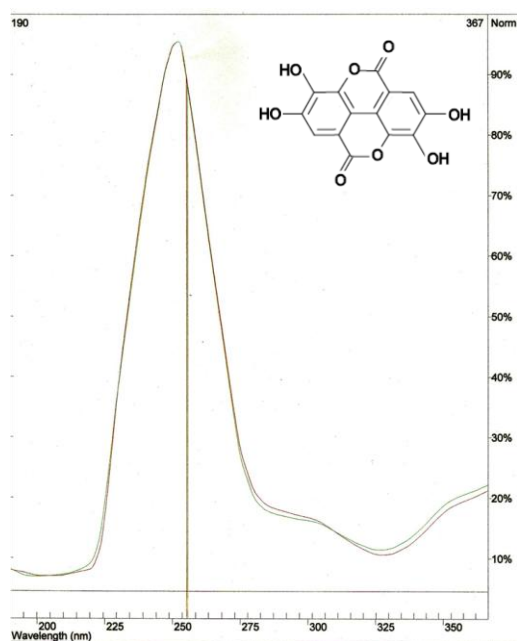
El pico (4) de  $t_r$  aprox. 34,8 min. coincidió en  $t_r$  y espectro UV con el patrón de referencia comercial ácido elágico (Fig.157). La presencia de ácido elágico fue confirmada en un nuevo sistema cromatográfico (Sistema II de la sección 5.4 de Materiales y Métodos) al coincidir  $t_r$  (19,7 min.) y espectro UV con el testigo de referencia comercial de ácido elágico (19,8 min.) (el cromatograma y espectro correspondiente al ácido elágico se exponen como información suplementaria en el capítulo IX ).

Los picos (1) (2) y (3) de  $t_r$  aprox. 15.7, 22.8 y 24.2 min respectivamente, fueron caracterizados como taninos hidrolizables por semejanza de sus espectros UV con los de los patrones de referencia comercial ácido gálico y ácido elágico (pico 3; Fig. 158).

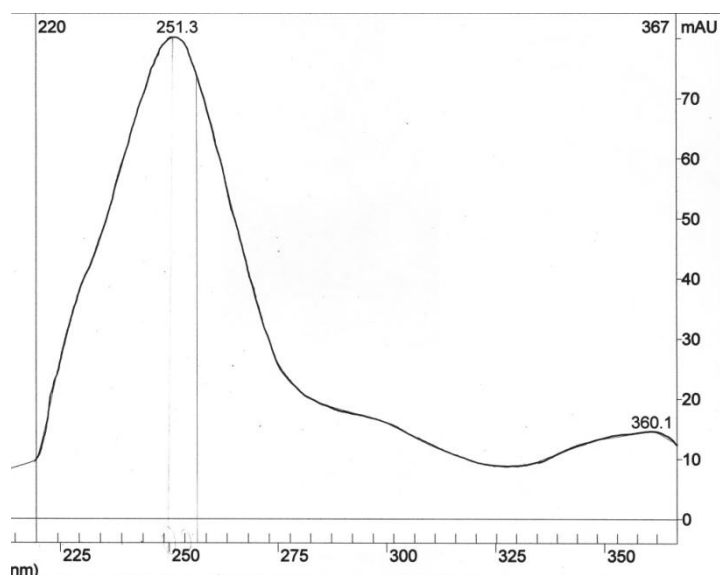
El pico (5) de  $t_r$  aprox. 36,5 min. correspondería, por su espectro UV, a un flavonoide. Los flavonoides en metanol presentan dos bandas de absorción características en la región comprendida entre 240 y 400 nm. El espectro UV correspondiente a este pico presentó dos  $\lambda_{max}$ : el primero a 347 nm correspondiente a la banda I y el segundo a 262 nm correspondiente a la banda II (Fig. 159). La posición de la Banda I permite distinguir a las flavonas de los flavonoles; la banda I de las flavonas aparece en el rango entre 302 y 350 nm, mientras que la de los flavonoles lo hace a longitudes de onda mayores (entre 352 y 385 nm) (Mabry y col., 1970). El máximo de absorción correspondiente a la banda I para el pico 5 apareció a 347 nm, indicando la posible presencia de una flavona.



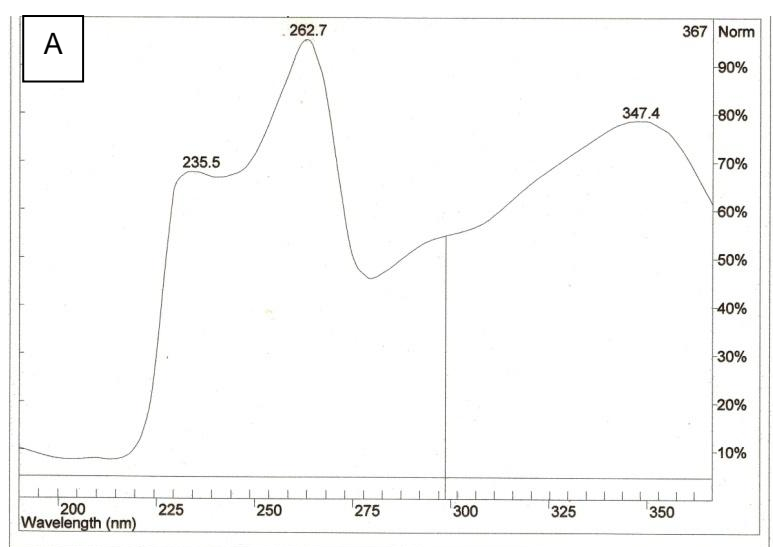
**Figura 156:** Perfil cromatográfico obtenido por CLAE de la fracción  $H_{AcOEt}$  del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*.



**Figura 157:** Espectro UV correspondiente al pico (4) de tr: 34.8 min. super-puesto al del patrón de referencia comercial de ácido elágico (tr: 35,14 min.)



**Figura 158:** Espectro UV correspondiente al pico (3) de tr: 24,17 min. de la fracción  $H_{AcOEt}$  de *C. tweedii*.



**Figura 159: A:** Espectro UV correspondiente al pico (5) de tr: 36,56 min. de la fracción  $H_{AcOEt}$  de *C. tweedii*.

## 2.2-Análisis por CLAE de la fracción $H_{Acuoso}$ .

El perfil cromatográfico obtenido por CLAE para la fracción  $H_{Acuoso}$  del extracto metanólico de hojas, obtenido en el sistema cromatográfico I, se presenta en la figura 162.

Se identificaron cromatográficamente por coincidencia de sus tr y espectros UV con los de los patrones de referencia comercial, los siguientes compuestos: el pico (1) de tr aprox. 4.1 min. corresponde al ácido gálico (Fig. 161), el pico (4) de tr aprox. 13.5 min. corresponde al ácido clorogénico (Fig. 162), el pico (10) de tr aprox. 34.4 min. corresponde a la rutina (Fig. 163).



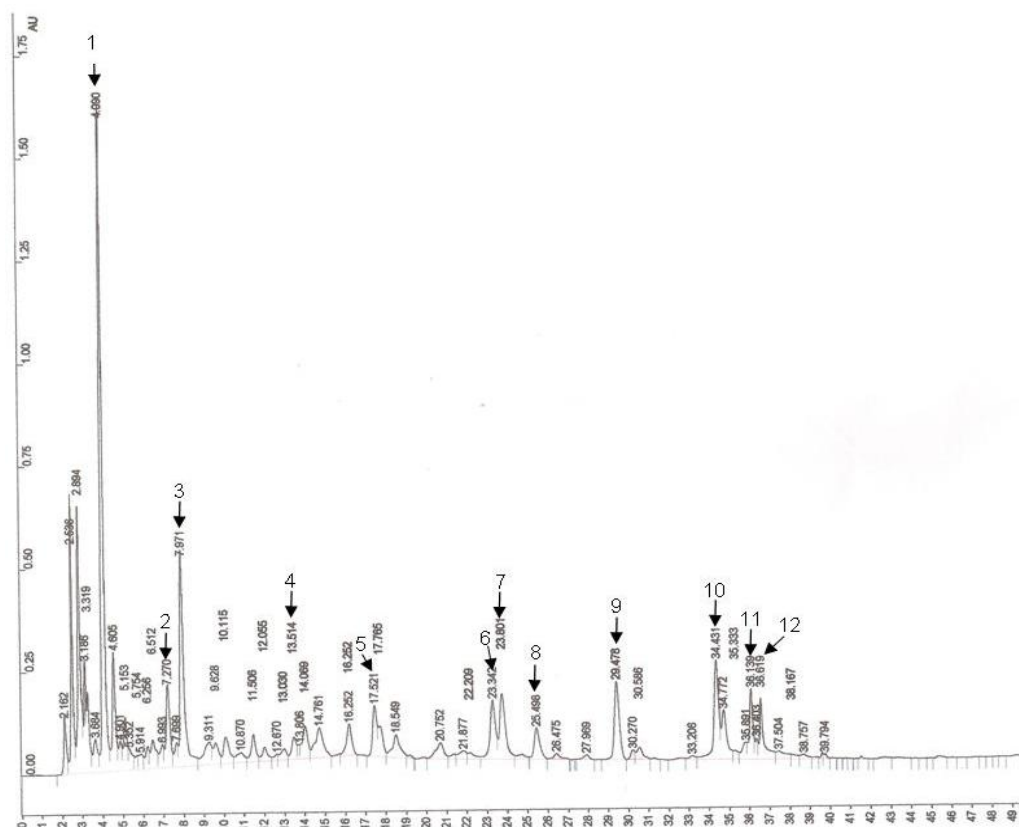
La presencia de ácido galico, ácido clorogenico y rutina en esta fracción fue confirmada en un nuevo sistema cromatografico (sistema II, sección 5.4 de Materiales y Métodos) al coincidir tr (ácido galico tr: 5,3 min.; ácido clorogenico tr: 11,1 min.; rutina tr: 19,1 min.) y espectro UV con los de los respectivos patrones de referencia comercial. Los cromatogramas y espectros se exponen como información adicional en el capítulo IX)

El pico (3) de tr aprox. 7,9 min. corresponde a un compuesto con un espectro similar al del ácido clorogénico, con dos  $\lambda_{\text{max}}$ : Uno a 238 nm y otro a 324 nm, sugiriendo la presencia de algún derivado cafeoil quínico (Fig. 164).

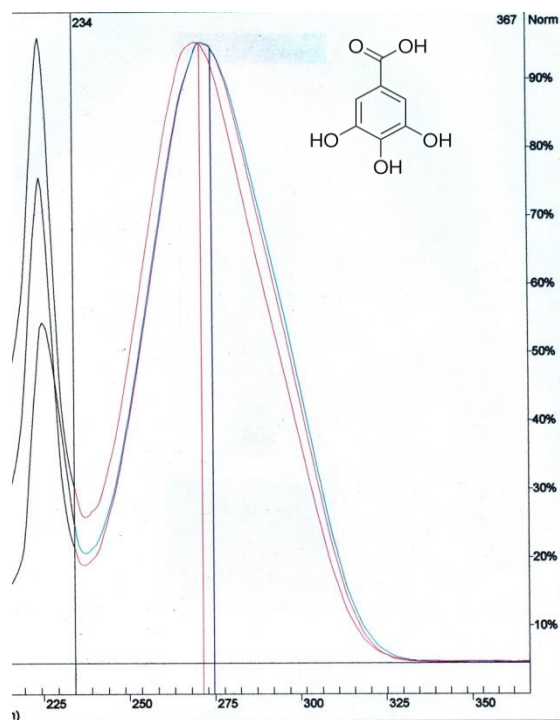
Los picos (2) de tr aprox. 7.3 min., (5) de tr aprox. 17.5 min., (6) de tr aprox. 23.4 min., y (7) de aprox. 23.8 min., fueron caracterizados como taninos hidrolizables, por semejanza de sus espectros UV con los de los patrones de referencia comercial.

Los picos (8) de tr aprox. 25.5 min. y (9) de tr aprox. 29.5 min. fueron caracterizados como flavonoles debido a que los máximos de absorción correspondientes a la banda I debida a la absorción del anillo B aparecen a 354 y 355 nm respectivamente (Mabry y col.,1970) (Fig. 165).

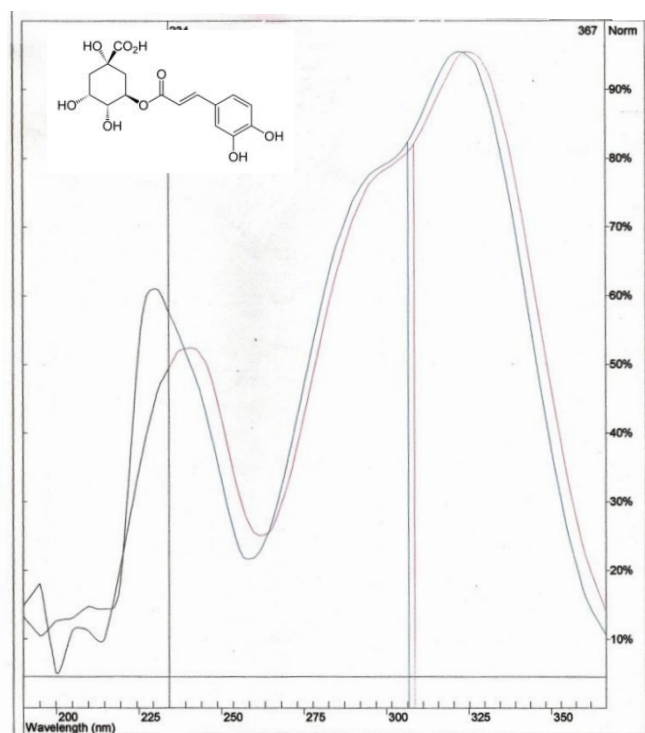
Los picos (11) de tr aprox. 36,1 min. y (12) de tr aprox. 36,6 min. fueron caracterizados como flavonas debido a que los máximos de absorción correspondientes a la banda I debida a la absorción del anillo B aparecen a 349 y 347 nm respectivamente (Mabry y col.,1970) (Fig. 166).



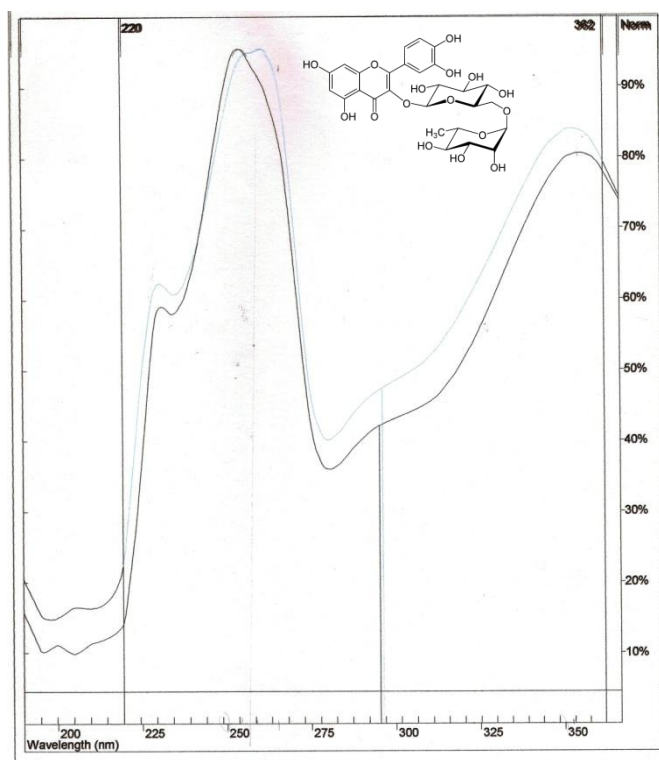
**Figura 160:** Perfil cromatográfico de la fracción H<sub>acuoso</sub> del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*.



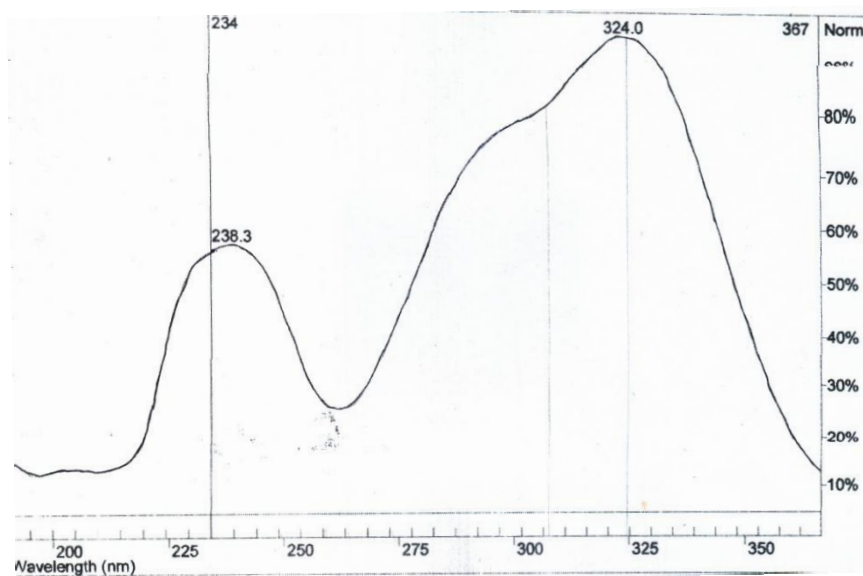
**Figura 161:** Espectro UV correspondiente al pico (1) de tr 4,09 min. junto con el del patrón de referencia comercial ácido gálico y el correspondiente a la co-cromatografía.



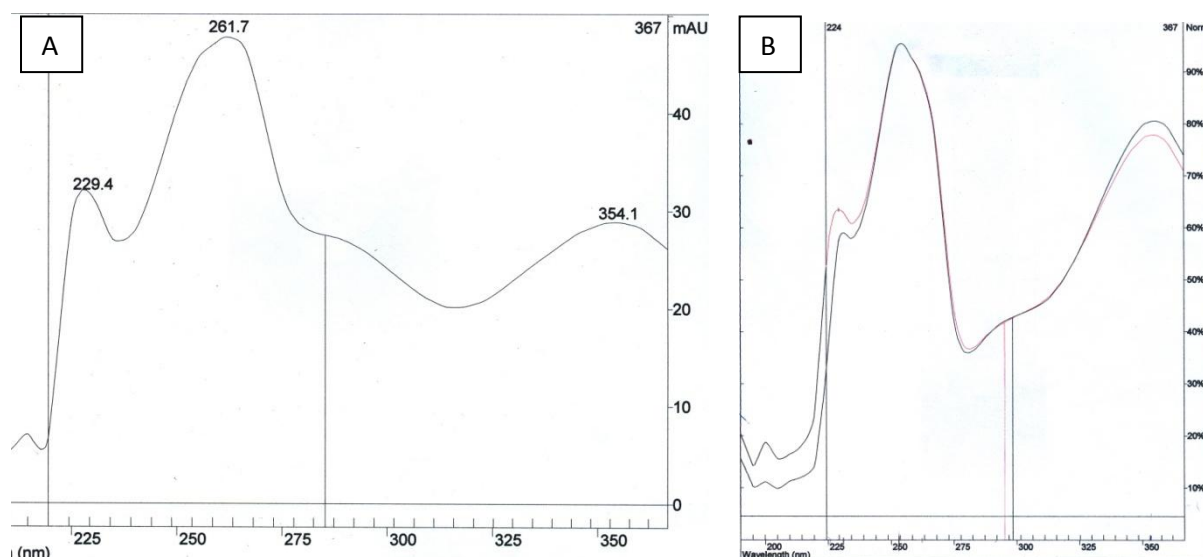
**Figura 162:** Espectro UV correspondiente al pico (4) de tr 13.51 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial ácido clorogénico (tr 13.57 min.).



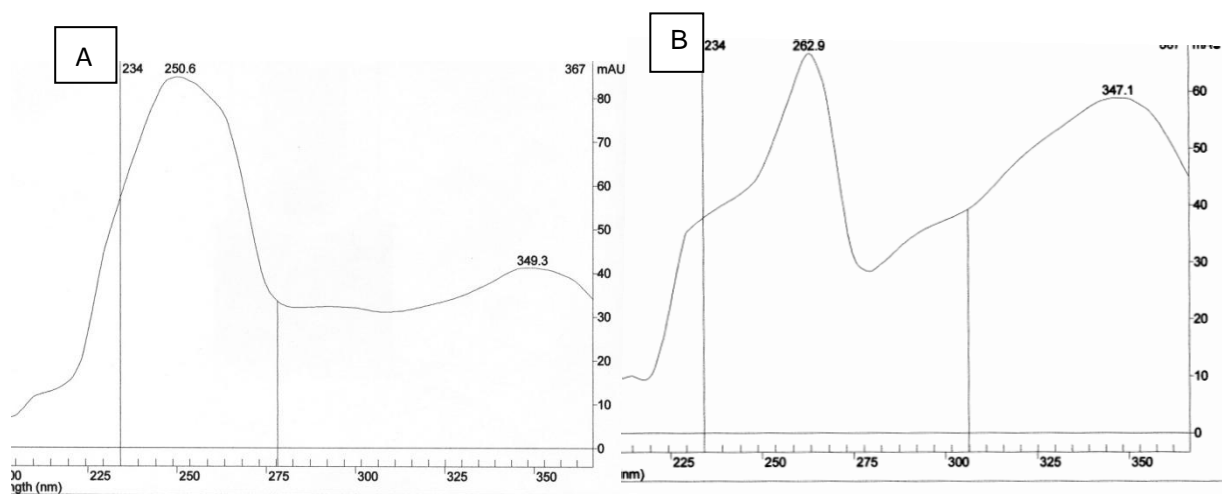
**Figura 163:** Espectro UV correspondiente al pico (10) de tr 34.4 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de rutina (tr: 34.52 min.).



**Figura 164:** Espectro UV correspondiente al pico (3) de tr 7,97 min. la fracción  $H_{acuosa}$ .



**Figura 165:** Espectros UV correspondientes a picos mayoritarios en la fracción  $H_{acuoso}$  **A:** Espectro correspondiente al pico (8) de tr 25.49 min.; **B:** Espectro UV correspondiente al pico (9) de tr aprox. 29.5 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de rutina.



**Figura 166:** Espectros UV correspondientes a picos mayoritarios en la fracción  $H_{acuoso}$  **A:** Espectro UV correspondiente al pico (11) de tr aprox. 36.14 min.; **B:** Espectro UV correspondiente al pico (12) de tr 36.71 min.



*Discusión Breve: Caracterización fitoquímica del extracto metanólico de hojas.*

Mediante la combinación de distintas técnicas de análisis: cromatografía en columna, CCD, extracción líquido-líquido y CLAE acoplada con detector UV/DAD, se caracterizaron los compuestos presentes en el extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*, que presentó actividad tripanocida e insecticida significativas. Así, se caracterizaron taninos hidrolizables, derivados cafeoil quinicos, flavonoles y flavonas mediante CCD, por las características de revelado, y mediante CLAE/UV DAD, por semejanza de sus espectros con los de patrones de referencia.

También, se determinó la presencia de ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico y rutina por CLAE/UV DAD al coincidir sus tr y espectros UV con los de los patrones de referencia comercial en dos sistemas cromatograficos. Este es el primer trabajo reportando la presencia de ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico y rutina en extractos de *C. tweedii*.

### *Estudio Morfoanatómico.*

El estudio morfoanatómico de las hojas, cortezas y leños realizado durante el presente trabajo de tesis permitió encontrar caracteres anatómicos comunes y diferenciales para las distintas especies en estudio. Dichos caracteres mostraron valor significativo en la sistemática de la familia y en el control de calidad de las drogas vegetales. Además, muchos de los caracteres endomorfológicos obtenidos están claramente relacionados con las condiciones ambientales en las que se desarrollan las distintas especies. Las variaciones morfoanatómicas en respuesta al ambiente se expresan mejor en la hoja, por lo que el espectro de variación de la anatomía foliar provee una indicación de la plasticidad ecológica de cada especie (Roth, 1984). De las especies estudiadas, *A. altissima*, *A. subovata*, *P. sellowii*, *P. parvifolia* y *P. crenata* son árboles de bajo porte que habitan fundamentalmente en 3 provincias fitogeográficas de Argentina: Provincia de las Yungas, Paranaense, y Chaqueña. Todos poseen hojas compuestas, caducas y membranáceas, de dimensiones variables. Los folíolos de *A. subovata* son los de menor tamaño, no superan los 4 cm de longitud y poseen una forma oblonga característica. Los folíolos de *P. crenata* poseen su borde ligeramente dentado o aserrado, al igual que los de *A. altissima* aunque estos últimos son distinguibles por las glándulas presentes en cada uno de los dientes en la base foliolar observables a simple vista. Los folíolos de *P. sellowii* y *P. parvifolia*, aunque poseen tamaños y forma muy similares, pueden diferenciarse por la presencia de glándulas pluricelulares, que se observan como puntos oscuros en el envés del folíolo de *P. parvifolia*. Solereder (1908) y Metcalfe y Chalk (1972) se refieren a la presencia de glándulas hundidas a las que llaman nectarios extraflorales, en algunas especies del género *Picramnia* y *Alvaradoa*. Por otro lado, *C. coccinea* y *C. tweedii* son arbustos espinosos que habitan las Provincias Chaqueña, del Monte, del Espinal y Paranaense. Éstos, presentan hojas simples, perennes y coriáceas de dimensiones reducidas. Las hojas de *C. coccinea* poseen borde entero, mientras que las hojas de *C. tweedii* poseen su borde dentado en la mitad superior de la lámina. Esta diferencia es una característica de valor de diagnóstico cuando se trata de diferenciar las dos especies por sus hojas.

La arquitectura foliar, el tipo de estoma anomocítico y posición al mismo nivel que las restantes células epidérmicas, se conserva para todas las especies coincidiendo con lo observado por Solereder (1908), con la salvedad de *A. subovata* que presenta estomas hundidos. En la especie arbustiva *C. coccinea* encontramos que los estomas presentan un anillo peristomático (reborde cuticular rodeando el ostiolo) lo que constituye una adaptación a ambientes secos y con alta luminosidad. *C. coccinea* y *C. tweedii* mostraron la mayor densidad estomática ( $461,7 \pm 50$  y  $353,5 \pm 71$  estomas/mm<sup>2</sup> respectivamente), mientras que para las especies que se desarrollan en ambientes mesofíticos, (en nuestro estudio: *A. altissima*, *A. subovata*, *P. sellowii*, *P. parvifolia* y *P. crenata*) el índice estomático es significativamente menor. Esta diferencia de densidad estomática coincide con lo propuesto por Roth (1984,

1990) quien considera que una adaptación de las especies que crecen en ambientes con déficit de agua es el incremento de la densidad estomática y la consiguiente reducción del tamaño de los mismos. Todas las especies estudiadas poseen una epidermis uniestratificada. *A. subovata* presenta una epidermis abaxial y adaxial papilosa. Solereder (1908) reporta la presencia de papilas en la epidermis inferior de especies del género *Alvaradoa*, pero Arambarri y col. (2009), al igual que lo observado en esta tesis, lo hacen en ambas epidermis y lo consideran como un carácter de gran valor taxonómico. En *P. sellowii*, *P. parvifolia*, *A. subovata* y *P. crenata* la epidermis adaxial en vista superficial presenta células poligonales con paredes anticlinales sinuosas a ligeramente sinuosas como sucede en especies mesomórficas, mientras que en *Castela coccinea* y *C. tweedii*, las paredes tienden a ser rectas y generalmente engrosadas. Estas características se observan en plantas que crecen en condiciones de aridez o en ambientes con mayor exposición a la radiación solar como sucede también en *A. altissima* (Stace, 1965). La cutícula engrosada particularmente en la superficie adaxial y en nuestro caso adaxial y abaxial en *C. coccinea* y *C. tweedii*, también se ha asociado a las condiciones de aridez en que se desarrollan éstas especies. Dicha cutícula tendría una acción mecánica para evitar que los tejidos colapsen cuando el déficit hídrico es marcado (Roth, 1992). Asimismo, se ha indicado que una cutícula gruesa y estriada, como sucede en *A. altissima*, árbol de gran porte y copa muy alta, contribuye a proteger a los tejidos fotosintéticos de una alta radiación solar por un incremento de la reflectancia (Roth 1984).

Un carácter de gran valor taxonómico lo constituye la hipodermis desarrollada presente en *C. coccinea* y *C. tweedii*. Arambarri y col. (2011), reportan también la presencia de una hipodermis por debajo de ambas epidermis de *C. coccinea* y consideran que esta hipodermis junto con la estructura isolateral del mesófilo, corresponden a caracteres xeromórficos de plantas cuyas hojas están expuestas a una fuerte radiación solar y a la acción deshidratante de los vientos. Más aún, en nuestro trabajo se ha detectado la presencia de mucílagos (compuestos hidrofílicos que facilitan la retención de agua en el cuerpo de la planta) en esta hipodermis que resaltan el carácter xeromórfico de *C. coccinea* y de *C. tweedii*. El mesófilo es de estructura dorsiventral en la mayoría de las especies, en cambio, en *C. tweedii* y *C. coccinea* este presenta varias capas de parénquima en empalizada que se acortan hacia el lado abaxial, llegando a ser isobilateral en *C. coccinea*. La presencia de varias capas de parénquima en empalizada es característico de plantas de zonas semiáridas y expuestas a mayor intensidad lumínica (Metcalf y Chalk, 1979). El tejido esclerenquimático tiene gran desarrollo y también es un carácter indicador de la estructura xeromórfica. Éste tejido actúa como soporte al prevenir el colapso y el daño de los tejidos causados por la desecación, en aquellas plantas expuestas a condiciones de aridez (Metcalf y Chalk, 1979).

Con respecto a los tricomas y estructuras secretoras coincidimos con Metcalfe y Chalk (1950) al observar la presencia de tricomas simples en todas las especies estudiadas, aunque su morfología y densidad varían para cada género. En el caso de *C. coccinea* y *C. tweedii* son

los únicos tricomas presentes. Estos, son tricomas con paredes delgadas y amplio lumen celular, infiriendo que podrían cumplir una importante función en la economía del agua, como la que realizan los tricomas de plantas de ambientes xéricos (Arambarri y col., 2011). *P. crenata* presenta también solo tricomas simples. *A. altissima* posee, además de los tricomas simples unicelulares, tricomas simples pluricelulares y glandulares de pie y cabeza pluricelular, en los cuales pudimos observar un contenido de naturaleza lipídica evidenciado por su tinción selectiva con el reactivo de Sudán IV. El contenido celular de los tricomas glandulares de *A. altissima* fue estudiado por Clair-Maczulajtys y Bory (1985), quienes demostraron que contenían lípidos, principalmente monogalactosil-diacylglicerol, ácido oléico, ácido palmítico y linoléico en estado libre. *P. parvifolia* y *P. sellowii* presentan tricomas simples y glandulares con pie uniseriado y cabeza pluricelular, *P. parvifolia* además presenta glándulas pluricelulares dispersas en la epidermis abaxial de los foliolos. Metcalfe y Chalk (1979) reportan la presencia de “glándulas hundidas”, a las que llamaron nectarios extraflorales, en la superficie abaxial de algunas especies de *Alvaradoa* y *Picramnia*. Se observaron también glándulas secretoras en la base de los foliolos de *A. altissima*, estas glándulas ya habían sido descritas previamente (Metcalfe y Chalk, 1972) y fueron objeto de una extensa investigación (Clair-Maczulajtys y Bory, 1983; Bory y Clair-Maczulajtys, 1990). Fueron caracterizadas como nectarios extraflorales (Kowarik y Säumel, 2007) y se conoce que juegan un importante rol en la regulación de la actividad fotosintética de la planta mediante la eliminación por excreción de los hidratos de carbono que se encuentran en exceso (Bory, y Clair-Maczulajtys, 1990).

Se observó la presencia de cavidades secretoras en la medula del nervio principal de cada foliolo de *P. crenata*, que por tinción diferencial, se comprobó que contenían lípidos y/o aceites. Arambarri y col., (2008) se refieren a la presencia de conductos secretores medulares en la vena media de las hojas de *P. crenata*, pero no infieren sobre su posible contenido.

En las especies estudiadas y en posiciones variables hemos localizado drusas, cristales rómbicos, y estiloides de oxalato de calcio. En relación a la función de los cristales de oxalato de calcio, Franceschi y Horner (1980) indican que se han atribuido varias funciones a los mismos, tales como mecanismos de inmovilización de calcio en la planta a fin de regular las funciones osmóticas, mecanismos de defensa contra la herbivoría o para el almacenamiento de Ca que la planta es capaz de utilizar cuando hay déficit de ese elemento. Se ha comprobado que la cantidad de cristales de oxalato de calcio puede ser proporcional a la cantidad de calcio disponible en el medio y que los idioblastos cristalíferos pueden funcionar como reservorios para la acumulación del mismo en algunas plantas (Kostman y Franceschi, 2000).

En general, las hojas de *A. altissima*, *A. subovata*, *P. sellowii*, *P. parvifolia* y *P. crenata*, presentan una compleja combinación de caracteres mesomórficos-xeromórficos asociada a una gran capacidad de adaptación a los ambientes donde se desarrollan, mientras que las hojas de *C. coccinea* y *C. tweedii* presentan caracteres foliares claramente xeromórficos.



Se define a la corteza como todos los tejidos localizados por fuera del cambium vascular e independientes de su estructura o composición (Trockenbrodt, 1990). La compleja estructura de la corteza refleja sus múltiples funciones, que incluyen soporte estructural y defensa o límite contra factores bióticos y abióticos que afectan al vegetal. A pesar de la riqueza de características y peculiaridades que nos ofrece la anatomía de la corteza, rara vez se la utiliza para consideraciones taxonómicas. Varios autores señalaron la importancia de sistematizar el estudio tanto en el nivel macro como microscópico, abarcando distintas edades de un vegetal para ver la variabilidad en los tejidos y definir los elementos útiles para el reconocimiento de las especies (Garlant y col., 2002).

La caracterización de las cortezas de Simarubaceae llevada a cabo en el presente trabajo de tesis es la primera contribución al respecto, ya que las mismas no habían sido descritas con anterioridad. Solereder (1908) y Metcalfe y Chalk (1972) sólo circunscriben a la especie *A. altissima* en base a las descripciones de Müller (1908). En general, para las cortezas no se encontraron caracteres que sean comunes a todas las especies, coincidiendo con lo planteado por Webber (1936) en su estudio sobre los leños de 58 especies de la familia Simaroubaceae, donde destaca el alto grado de polifilia y la falta de caracteres distintivos de la familia. *A. subovata*, *P. parvifolia* y *P. sellowii* presentan ritidoma constituido por una única peridermis exfoliante. De acuerdo con Fahn y Cutler (1992), la presencia de un ritidoma delgado corresponde a árboles que crecen en zonas tropicales, como sucede con las tres especies mencionadas. *P. crenata* constituye una excepción, porque a pesar de que su hábitat es la selva Paranaense, muestra un ritidoma constituido por 5 a 7 peridermis, esto podría deberse a que, a pesar de que el espesor de la corteza es un carácter propio de cada especie, está altamente influenciado por los factores ambientales. El número de peridermis acumuladas en el ritidoma es indicativo de algunas condiciones del medio. Cuando el vegetal requiere de una mayor protección ante condiciones extremas, se acumulan mayor número de capas protectoras de súber, hasta un límite característico para cada especie (Roth, 1981). Entonces, en el caso de *P. crenata*, se infiere que desarrolla éste carácter debido al ambiente de alta radiación en que habita. Por otro lado, coincidiendo con Roth (1981), se observa que *C. coccinea* y *C. tweedii*, que se desarrollan en hábitat xerofíticos, presentan de 2 a 7 peridermis conspicuas que cumplen con funciones de protección ante las condiciones de aridez del medio, temperatura y radiación elevadas. Con referencia a los cambios cuantitativos durante el desarrollo de la corteza, se destaca el aumento continuo de la corteza total con la edad, hasta alcanzar un máximo. (Roth, 1981; Trockenbrodt, 1994).

En general las células del súber, sufren un engrosamiento característico en forma de “U” en sus paredes a expensas de suberina y otras sustancias. El grado de engrosamiento observado es variable: en *A. altissima* es mediano y heterogéneo; en *P. crenata* es delgado y uniforme. En *A. subovata*, *P. parvifolia* y *P. sellowii* el engrosamiento es mediano y heterogéneo, con las células basales lignificadas en forma de “U”. *C. coccinea* y *C. tweedii*

presentan células del súber con engrosamientos medianos heterogéneos con la presencia de algunas hileras de células con engrosamiento en “U” en *C. tweedii*. Douliot (1889), atribuye la presencia de súber grueso en los tallos expuestos a una intensa iluminación, en tanto Starr (1912) lo relaciona con el xeromorfismo. La felodermis es pluriestratificada en todas las especies estudiadas a excepción de *C. tweedii* donde se observó una felodermis uni o biestratificada. En la corteza externa el parénquima cortical presenta desarrollo variable pudiendo llegar a estar ausente como en *P. crenata*, *C. coccinea* y *C. tweedii*. En todas las especies estudiadas a excepción de *P. crenata* se determinó la presencia de grupos heterogéneos de esclerénquima compuesto de dimensiones variables que se extienden hasta el floema funcional. Este esclerénquima se halla constituido por macroesclereidas, braquiesclereidas, y fibras que presentan longitud variable y paredes fuertemente engrosadas. En *P. crenata* el único elemento esclerenquimático presente lo constituyen las fibras. Del análisis de ésta característica surge que las especies que habitan la *Provincia de la Yunga* y la *Provincia Paranaense* desarrollan una escasa esclerificación de esa zona de la corteza. En el caso de *P. crenata* la esclerificación falta, y se suple por una corteza externa muy desarrollada (Trockenbrodt, 1990). *C. coccinea* y *C. tweedii*, que habitan el Dominio Chaqueño, presentan una corteza con un fuerte desarrollo de esclerénquima compuesto, dado por macroesclereidas y braquiesclereidas plurilameladas. Algunas de las ellas llevan incluidos cristales rómbicos de oxalato de calcio. Asociadas o independientes a las esclereidas encontramos fibras con paredes gruesas. Éstas, en la corteza interna, se disponen en estratos o placas superpuestas que alternan con los elementos del floema funcional adoptando la disposición de peldaños de escalera, limitado lateralmente con los radios floemáticos. Las células de parénquima de radio contienen drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio. De ésta manera, se origina un dibujo de cuadrícula en la corteza interna de éstas especies. La fuerte esclerificación de la corteza de las especies de *Castela* se suma a otros caracteres xerofíticos que se correlacionan con el hábitat en el que se desarrollan y coincidimos con Roth (1981) quien reconoce que la posición de las fibras constituye un criterio de valor diagnóstico.

El parénquima radial se organiza en radios floemáticos de 1 a 7 seriados en *A. altissima* y *P. crenata*, siendo los de *P. crenata* muy sinuosos y torsionados. En *C. coccinea*, *C. tweedii* y *P. sellowii* los radios floemáticos presentan una dilatación distal en forma de embudo, que produce un crecimiento por dilatación de la corteza. Cuando los radios floemáticos no presentan dilatación, como muestra *A. altissima*, *A. subovata*, *P. parvifolia* y *P. crenata* se observa que las células del parénquima cortical sufren un alargamiento tangencial y posterior división anticlinal como resultado de un crecimiento secundario (Esau, 1969, Roth, 1981). Según la especie los radios pueden ser homogéneos o heterogéneos, en las especies estudiadas predominan los heterogéneos. La presencia de células procumbentes y erectas en los radios floemáticos constituye un carácter más evolucionado (Kribs, 1935).

Los cristales de oxalato de calcio presentes en las cortezas coinciden con los observados en las hojas. La morfología de los cristales así como su distribución espacial, se conserva dentro de un taxón específico y es un proceso genético fuertemente regulado (Nakata, 2002). Así, encontramos estiloides en el parénquima axial de *A. subovata*, drusas en el parénquima axial de *A. altissima*, drusas y cristales poliédricos en el parénquima radial de *C. tweedii*, *C. coccínea* y *P. crenata* y drusas y cristales poliédricos en el parénquima axial de *P. parvifolia* y *P. sellowii*. El tamaño y cantidad de cristales puede ser regulado por la planta en respuesta a cambios en la concentración de calcio en ambiente donde crece el vegetal (Nakata, 2003).

En el floema funcional los elementos cribosos se organizan en hileras radiales y, dependiendo de la especie, en racimos radiales de más de cuatro células, interrumpidos por parénquima axial; su abundancia depende de la especie. De contornos poligonales, placas cribosas terminales ligeramente oblicuas y hasta horizontales, las áreas cribosas aparecen en todo el elemento criboso. *A. altissima* y *P. crenata* son las dos únicas especies que presentan cavidades esquizolisígenas de secreción en el floema funcional, según Roth (1981) estos conductos secretores habitualmente dejan de funcionar en la corteza externa.

De los caracteres obtenidos de la estructura anatómica de los leños de las especies estudiadas, podemos afirmar que, al igual que corteza, existen escasas analogías entre ellas, coincidiendo con Webber (1936). Esta falta de caracteres comunes permite, sin embargo, lograr una adecuada diferenciación de géneros y especies. Los únicos caracteres comunes a todas las especies, determinados en la presente investigación, lo constituyen, la presencia de vasos solitarios, geminados y múltiples de distribución radial, el contorno circular de los mismos; la presencia de placa de perforación simple y las puntuaciones intervasculares areoladas alternas. Estos caracteres también fueron reportados por Webber (1936) y Metcalfe y Chalk (1972). O' Donnell (1937) en su estudio de los leños de tres Simaroubaceae de Argentina, *A. subovata*, *C. coccínea* y *P. crenata*, quien reporta la presencia de placas de perforación simple y puntuaciones areoladas alternas para la tres especies. Las punteaciones intervasculares alternas son consideradas como el tipo de punteadura más evolucionado, en comparación con los escalariformes y opuestos, y las más eficientes para la conducción (León, 2005). Sumado a esto, la presencia de placas de perforación simple y de vasos múltiples de distribución radial en todas las especies estudiadas, optimizan la conducción al favorecer el movimiento de grandes cantidades de agua por unidad de tiempo y maximizar la seguridad del sistema hidráulico al proporcionar vías alternativas para la conducción (Villagra y Roig, 1997).

El crecimiento del leño es anular en *A. altissima* y *A. subovata*, pero la porosidad es anular uniforme para la primera y difusa no uniforme para la última, coincidiendo con lo observado por Webber (1936) y O'Donnell (1937) respectivamente. En *C. coccínea*, *C. tweedii* y *P. crenata* el crecimiento es semianular con tendencia a anular, pero la porosidad es difusa con tendencia semianular para el género *Castela*, y difusa con tendencia anular para *Picrasma*.

Aquí coincidimos en parte con O'Donnell (1937) cuando expresa que la porosidad de *P. crenata* es circular aparente y en *C. coccinea* es anular no muy notable. En *P. sellowii* y *P. parvifolia* se observó un crecimiento semianular y porosidad difusa uniforme, al igual que lo observado por Webber (1936) para otras especies del género *Picramnia*. Ellmore y Ewers (1985), consideran ventajosa para la conducción la presencia de poros dispuestos en anillos. El significado funcional de la porosidad circular es que probablemente permite una conducción rápida en el leño de primavera a través de los vasos grandes asegurándose la continuidad de la conducción mediante vasos pequeños en el leño de verano (Woodcock, 1989). La distinción entre leño de primavera y verano es evidente en los leños de *P. crenata* y *A. altissima*, sus poros, en el leño de primavera, presentan diámetros tangenciales entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ , éste hecho favorece el movimiento de grandes cantidades de agua por unidad de tiempo por vaso. Se sugiere que *A. altissima* y *P. crenata* se han especializado para manejar mayores volúmenes de agua, en comparación con las especies restantes, que presentan vasos más pequeños. Por otro lado, el resto de las especies estudiadas presentan vasos con diámetros menores, que oscilan entre 15 y 40  $\mu\text{m}$  en *P. parvifolia* y *C. tweedii*, y entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  en *A. subovata*, *P. sellowii* y *C. coccinea*. Sin embargo, *C. coccinea* y *C. tweedii* presentan mayor densidad de vasos (209 y 273 vasos por  $\text{mm}^2$  respectivamente), en comparación con las restantes especies, coincidiendo con León (2005) y Lindorff (1994) quienes proponen que el número de poros por  $\text{mm}^2$  es mayor en plantas que se desarrollan en condiciones de aridez o salinidad que en plantas de ambientes tropicales o mesofíticos. *C. coccinea* y *C. tweedii* presentan, además, elementos de vaso de longitud corta (150 a 296  $\mu\text{m}$ ), lo que también corresponde a los ambientes secos en los que se desarrollan. Carlquist (1966), sostiene que la longitud de los elementos vasculares disminuye con la aridez. Los elementos vasculares más cortos son más fuertes a causa de la constricción formada por cada pared que permiten resistir grandes presiones y deformaciones relacionadas con las tensiones de las columnas de agua. Otra posibilidad es que vasos cortos son capaces de reducir el embolismo en mayor grado que los vasos largos. En contraste, especies como *A. altissima*, *A. subovata*, *P. parvifolia*, *P. sellowii* y *P. crenata* que son representantes de ambientes más húmedos presentan elementos de vasos largos (> 350  $\mu\text{m}$ ) quienes les otorgan una mayor eficacia conductora (Carlquist, 2001).

Se encontraron placas de perforación simple en el leño de todas las especies analizadas. La conectividad que se da entre los elementos del vaso genera un aumento en la conductividad hidráulica. Estos caracteres, asociados a la presencia de punteaduras intervasculares areoladas alternas, ofrecen una mayor seguridad a los elementos de vaso, ya que éstas permiten el flujo de agua a los vasos adyacentes para prevenir embolismos en el caso de vegetación xerófita, (Carlquist, 1980, 2001)

*A. subovata*, *P. sellowii* y *P. parvifolia* poseen fibras septadas y no septadas, y fibrotarqueidas dispuestas en forma dispersa, no estratificada, coincidiendo con lo observado por Webber (1936), quien considera, además, que las fibrotraqueidas constituyen el elemento



predominante en los leños de distintas especies de los géneros *Alvaradoa* y *Picramnia*. En *A. altissima* se observan fibras y fibrotraqueidas dispuestas en grupos no estratificados, pero al igual que en *P. crenata* estas poseen paredes delgadas. Según Weeber (1936), las fibrotraqueidas constituyen el elemento principal en los leños de distintas especies de *Ailanthus* y *Picrasma*. Carlquist (1988, 2001), considera que las fibras con paredes celulares pocos engrosadas, como las encontradas en *P. crenata* y *A. altissima*, son propias de vegetales de regiones húmedas de climas templados. Por el contrario, el elemento predominante en los leños de las especies pertenecientes al género *Castela*, lo constituyen las fibras libriformes siendo estas de paredes muy engrosadas. Esto es lo encontrado en *C. tweedii* y *C. coccinea*, donde se observan gran cantidad de grupos inter-radiales de fibras libriformes de paredes gruesas y disposición estratificada, éste es un carácter distintivo del leño del género *Castela* que lo diferencia de los restantes géneros de la familia (Weber 1936). La presencia de fibras de paredes muy gruesas, altamente lignificadas, además, es patrimonio de la vegetación de zonas áridas (Carlquist 1988, 2001).

El parénquima axial es escaso en *A. subovata*, *P. sellowii* y *P. parvifolia*, aunque difuso en *A. subovata* y con tendencia a metatraqueal en *Picramnia*. Un parénquima axial escaso es congruente con la presencia de fibras septadas, observadas también en dichas especies, pues estas fibras sustituyen al parénquima en su función de reserva (Carlquist, 1988). En *A. altissima*, *C. coccinea*, *C. tweedii* y *P. crenata* el parénquima axial es paratraqueal, vasicéntrico en *A. altissima* y *Castela*, y confluyente en *P. crenata*. Webber (1936) considera que el parénquima es vasicéntrico para la mayoría de las especies y que su abundancia es variable y reporta que éste es escaso y difuso en *Alvaradoa* y *Picramnia*.

Coincidiendo con Weeber (1936), se observó que el parénquima de radio se encuentra representado por radios leñosos heterocelulares en todas las especies estudiadas a excepción de *C. tweedii* y *C. coccinea* donde encontramos radios homocelulares constituidos únicamente por células procumbentes. Los radios leñosos de *A. altissima* son multiseriados en su mayoría y presentan variados tamaños, desde 8 a 30 células de altura, característica también destacada por Jaccard (1921) y Weeber (1936). Los radios de *P. crenata* son claramente distinguibles por la presencia de gran cantidad de cristales poliédricos principalmente en las células procumbentes, coincidiendo con lo expresado por Oliveira y col., (2005).

Los índices de vulnerabilidad calculados tratan de expresar la seguridad de conducción ante la diferencia de condiciones ambientales en donde se pueda desarrollar un individuo. Valores bajos indican una alta redundancia de los vasos o, en otras palabras, una menor vulnerabilidad a sufrir embolismos. Valores menores de uno representan, por lo tanto, a maderas xeromórficas y valores mayores a la unidad corresponden a maderas mesomórficas (Carlquist, 1977). Esto fue lo observado en el presente estudio: Los leños de *C. coccinea* y *C. tweedii* presentaron valores de IV menores a uno, siendo estas especies las de mayor carácter xerofítico de todas las estudiadas. Los valores para las restantes especies oscilaron entre 1,04

(*P. parvifolia*.) y 5,88 (*A. altissima*), estos valores, menores a 10, indican eficiencia en la conducción combinada con cierto grado de seguridad (León, 2005). Con relación al índice de mesomorfía, los valores obtenidos oscilaron entre un mínimo de 390 (*P. parvifolia*.) y un máximo de 1.699 (*A. altissima*), valores distintivos de leños con características mesofíticas (Carlquist, 1977). *Castela coccínea* y *C. tweedii*, por otro lado, presentaron valores de 46,60 y 16,4 respectivamente. Valores de IM menores a 75 corresponden a leños xerofíticos, confirmando el carácter xerofítico de los leños de *C. tweedii* y *C. coccínea*. Los valores de índice de mesomorfía tienen un rango de variación mucho mayor que el índice de vulnerabilidad. Esto se debe a que en el cálculo de los valores de mesomorfía se incluye la longitud de los elementos vasculares, característica que está relacionada directamente con el grado de especialización, por lo que, especies que crecen en una misma área tendrán distintas tendencias en cuanto al índice de mesomorfía de acuerdo a su grado evolutivo. Por esta razón se consideran más confiables los valores correspondientes al índice de vulnerabilidad. Aunque es un hecho aceptado que la longitud de los elementos vasculares tiene una influencia notable sobre la eficiencia de la conducción, la longitud total del vaso es más importante que la de sus elementos individuales y el índice de mesomorfía no toma en consideración esta longitud total de los vasos. Oever y col. (1981) indican que además del diámetro y frecuencia de poros, parámetros como la longitud total de los vasos y la proporción de tejido con actividad fisiológica de conducción pueden ejercer una notable influencia sobre la eficiencia del movimiento de líquidos en el xilema. Según Carlquist y Hoekman (1985) los principales indicadores de mesomorfía son: número reducido de vasos por mm<sup>2</sup>, amplio diámetro de poros, elementos vasculares largos y ausencia tanto de traqueidas como de engrosamientos espiralados. Lindorf (1994) señala que las especies con rasgos mesomórficos desarrollan una estructura conectada con una alta eficiencia, pero una baja seguridad de conducción, lo cual se manifiesta con vasos o poros de mayor tamaño y en menor número por unidad de superficie. Estas características coinciden con lo observado en el presente estudio para *A. altissima*, *A. subovata*, *P. parvifolia*, *P. sellowi* y *P. crenata*. Por el contrario, los leños de *C. tweedii* y *C. coccínea* presentan elementos de vasos angostos y de menor longitud, mayor frecuencia de poros, mayor tendencia al agrupamiento de los mismos, y la presencia de fibras de paredes fuertemente engrosadas como elemento predominante del xilema, todos caracteres propios de leños xerofíticos.

Desde el punto de vista morfoanatómico de las especies estudiadas coincidimos con distintos autores (Webber, 1936; Cronquist, 1968; Fernando y col., 1995; Gadek y col., 1996) en destacar el alto grado de polifilia presente en la familia. Los caracteres morfoanatómicos de las hojas, cortezas y leños de las especies nativas argentinas obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis aportan nuevas evidencias que respaldan la exclusión de los géneros *Picramnia* y *Alvaradoa* de la Familia Simaroubaceae *sensu* Engler (Engler, 1931) y, más aún, fuera del orden Sapindales. Se acepta la creación de un nuevo clado: Picramniaceae,

que incluye a los dos géneros mencionados (Fernando y col., 1995; Fernando y Quinn, 1995). Destacamos, al igual que Webber (1936), que las especies del género *Castela* estudiadas en el presente trabajo de tesis difieren ampliamente del resto de los géneros de la Familia debido a la estructura mucho más especializada o adaptada a ambientes áridos de sus leños, cortezas y hojas.

#### *Actividad antioxidante.*

El rol de las especies reactivas del oxígeno en distintas enfermedades y el potencial efecto antioxidante protector de los productos naturales sobre dichos desordenes constituyen uno de los tópicos de mayor interés e investigación en los últimos tiempos (Repetto y Llesuy, 2002). En numerosas ocasiones las propiedades terapéuticas de distintas plantas utilizadas en la medicina popular se deben a la presencia de estos compuestos con capacidad depuradora de especies reactivas del oxígeno (Desmarchelier y col., 1999; Cieřlik y col., 2006; Halliwell, 2007; Johnson, 2001; Virgili y col., 2001). Por tales motivos se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de las especies nativas de la familia Simaroubaceae frente al radical libre DPPH. El reactivo DPPH, debido a su alta electrofilicidad, reacciona con los compuestos fenólicos, de manera casi indiscriminada (Molineux, 2004) reflejando, por lo tanto, la capacidad global de los antioxidantes presentes en el extracto para actuar como depuradores de radicales libres, sin importar su composición.

Todos los extractos etanólicos de corteza y hojas demostraron tener capacidad depuradora de radicales libres significativa. Para *A. subovata*, *P. sellowii* y *P. parvifolia* fueron levemente más activos los extractos de corteza que los de hojas. El extracto más activo fue el etanólico de corteza de *A. subovata*, con una  $CI_{50}=0,0036\text{mg/mL}$ , valor mucho más bajo que el de los restantes extractos activos y del mismo orden de magnitud que el control positivo utilizado: el ácido ascórbico, reconocido compuesto antioxidante. El análisis cualitativo de este extracto nos permitió caracterizar antraquinonas y polifenoles como los responsables de la capacidad depuradora. Dentro de los polifenoles, por sus características de tinción (Wagner y Bladt, 2001), se pudo inferir la presencia de flavonoides y taninos. Se detectó cromatográficamente ácido clorogénico y rutina, ambos compuestos de reconocida actividad antioxidante (La Casa y col., 2000). Por otro lado, los taninos se encuentran entre los metabolitos secundarios de mayor polaridad y se sabe que entre sus propiedades se distingue la capacidad antioxidante (Amarowicz y col., 2009; Gu y col., 2008).

Para las restantes especies: *C. coccinea*, *C. tweedii* y *P. crenata*, fueron más activos los extractos de hoja que los de corteza. El extracto que presentó mayor actividad fue el etanólico de hoja de *C. coccinea*, con una  $CI=0.025\text{ mg/mL}$ . En general, las bandas correspondientes a compuestos con actividad depuradora del radical DPPH se correspondieron también a compuestos de naturaleza polifenólica, principalmente taninos, ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides en todas las especies. Para cada especie en particular estas bandas presentaron

distintas intensidades y polaridades, lo que nos estaría indicando que los compuestos responsables de la actividad antioxidante, en cada extracto, se encuentran en distintas concentraciones y poseen distinta cantidad y tipo de sustituyentes en sus estructuras básicas. El análisis cualitativo de los extractos de hojas de *C. coccinea* y *C. tweedii* permitió caracterizar la presencia de flavonoides y taninos en los mismos. Se observó, al igual que en los anteriores extractos, la presencia de una banda con características de tinción y  $R_f$  coincidentes con la rutina y el ácido clorogénico (Wagner y Bladt, 2001). La presencia de compuestos polifenólicos en las hojas de *C. tweedii* y *C. coccinea* fue también confirmada en los ensayos histoquímicos realizados. En los mismos se observó la presencia de gran cantidad de polifenoles en el parénquima en empalizada de las hojas. Los flavonoides y los compuestos fenólicos en general, como ácidos fenilcarboxílicos, taninos, cumarinas y ligninas, son especialmente comunes en hojas, flores, cortezas y leños (Larson, 1988). Los polifenoles son importantes en la planta para el normal desarrollo de la misma, en la defensa contra infecciones y daños a los tejidos vegetales y son los responsables de los colores encontrados en flores, frutos y hojas (Kähkönen y col., 1999). Se les ha atribuido múltiples efectos biológicos, incluyendo actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante (Harborne y Williams, 2000). La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se debe a sus propiedades redox, las cuales les permiten actuar como agentes reductores, dadores de hidrogeno y depuradores del oxígeno *in vivo* e *in vitro*, además de la propiedad de quelar metales (Rice-Evans y col., 1995). Diversos autores coinciden en afirmar que también contribuyen en la prevención de lesiones gástricas inducidas por diversos factores (Alarcón de la Lastra y col., 1993) y poseen actividad gastrointestinal cito-protectora (Repetto y Llesuy, 2002). En particular la rutina, además de ser un potente depurador de los radicales hidroxilo y superóxido (Bonbardelli y Marazzoni, 1993), presenta un efecto gastro-protectivo relacionado con sus propiedades antioxidantes (La Casa y col., 2000). Más aún, La Casa y col. sugieren que este flavonoide debería utilizarse en tratamientos clínicos de desórdenes gástricos. Por otro lado, la acción farmacológica de los taninos deriva de sus propiedades astringentes, por vía interna ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico (Evans, 2002). El efecto medicinal atribuido a las infusiones de corteza y hojas de distintas especies de Simaroubaceae podría deberse, en parte, a la presencia de los polifenoles, especialmente taninos y flavonoides, y de su habilidad como depuradores de radicales libres. Por otra parte, los mucílagos, también presentes en las hojas de *C. tweedii* y *C. coccinea*, como se demostró en las pruebas histoquímicas realizadas, poseen diversos usos medicinales, y tanto los taninos como los mucílagos poseen efecto benéfico demostrado sobre úlceras, inflamaciones e irritaciones intestinales, diarreas y disentería (Morton, 1990).

#### *Actividad tripanocida*

La búsqueda de un tratamiento antiparasitario específico para el mal de Chagas ha sido sujeto de un intenso debate en los últimos años, las quimioterapias utilizadas actualmente,



basadas en el uso de Nifurtimox y Benznidazol, resultan insatisfactorias debido a la eficacia limitada de las mismas durante la fase crónica de la enfermedad y de sus efectos secundarios tóxicos (Sülsen y col., 2007). Una de las estrategias más utilizadas en los últimos años para la detección de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades parasitarias consiste en la búsqueda de nuevas drogas a partir de fuentes naturales (Coura y Castro, 2002). Los criterios utilizados para la búsqueda de especies vegetales con potenciales compuestos bioactivos son: seleccionar las plantas por sus usos tradicionales, por pertenecer a familias botánicas conocidas a partir de las cuales se han aislado compuestos activos o, a partir de plantas que se sabe poseen metabolitos característicos con actividad antiparasitaria probada (Muschiatti y col., 2013). En este sentido la familia Simaroubaceae cumple ampliamente los mencionados criterios de búsqueda: numerosas especies pertenecientes a la familia han sido utilizadas tradicionalmente como antiparasitarias (Soto de Villatoro y col., 1974; Chan y col., 1986; Trager y Polonsky, 1980) y existen numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* de la actividad antimalárica de extractos y de principios activos aislados de distintas especies pertenecientes a la familia (Spencer y col., 1947; Moretti y col., 1994; Francois y col., 1998). Más aun, se ha demostrado que cuasinoides aislados de distintas especies de Simaroubaceas poseen actividad antimalárica contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina (O' Neill y col., 1986; Ang y col., 1995). Por tales motivos se decidió evaluar la actividad antiparasitaria de los extractos de las especies de Simarobaceas nativas frente un protozoo endémico en nuestro país: el *Tripanosoma cruzi*. Los extractos más activos fueron los de corteza y madera de *P. crenata* (97 y 99% de inhibición del crecimiento del parásito respectivamente), madera de *A. subovata* (80%), madera de *C. tweedi* (78%) y hoja de *C. coccínea* (70%). Los extractos que superan el 70% de inhibición del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*, se consideran activos y se sugiere que, solo los compuestos o extractos que produzcan un efecto tripanocida similar o mayor al del Benznidazol deberían ser considerados para las siguientes etapas de evaluación (Muschiatti y col., 2013; Sülsen y col., 2007). Los extractos de corteza y madera de *P. crenata* produjeron inhibición del crecimiento cercano al provocado por el control (Benznidazol), sin embargo, esta alta actividad tripanocida no fue inesperada puesto que la actividad biológica de esta especie se encuentran ampliamente documentada, *P. crenata* es una especie conocida por su actividad antiparasitaria en la medicina popular (Koike y Ohmoto, 1990) y existen numerosas publicaciones sobre su actividad insecticida y antiparasitaria (Debenedetti y col., 2002; Roldan y col., 2007; Novello y col., 2008; Rodriguez y col., 2008, 2011), por lo que se decidió no continuar con su estudio. En cambio, con el extracto de madera de *A. subovata*, que presento un 80% de inhibición del crecimiento del parásito, se continuó con un estudio más detallado de la actividad, dicho análisis fue realizado como parte de un trabajo de Tesis de grado conducido por un equipo de trabajo de la Cátedra de Farmacobotánica. Se calculó la concentración inhibitoria del extracto *A. subovata* Madera<sub>DCM</sub> y fue de 63 µg/mL; el cálculo del parámetro IC<sub>50</sub> nos permite denotar el

grado de actividad que presenta una muestra: un valor bajo revela que el extracto evaluado posee elevada actividad antiparasitaria. El fraccionamiento del extracto permitió detectar antraquinonas, entre ellas pudo identificarse la emodina, y compuestos polifenólicos pero no de cuasinoides (Martínez y col. 2013a) coincidiendo con la observación de Jacobs (2003) y Fernando y Quinn (1995). Considerando que antraquinonas aisladas de *Picramnia antidesma* demostraron poseer actividad antimálarica y frente a otras especies de protozoos (Solís y col., 1994; Hernández-Medel y Pereda-Miranda, 2002; Camacho y col., 2003), podríamos afirmar que para los extractos de *A. subovata* probablemente exista una correlación entre la actividad del extracto y las antraquinonas presentes en el mismo.

Bourdy y col. (2004) demostraron que extractos de hojas de *C. coccinea* poseían una fuerte actividad contra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria, por tal motivo se evaluó, en primera instancia, la actividad tripanocida de los extractos etanólicos y diclorometánicos de *C. coccinea*. Todos los extractos mostraron actividad a la concentración más alta ensayada (250 µg/mL). Los extractos etanólico de hoja y diclorometánico de madera presentaron actividad aun a concentraciones muy bajas (30 µg/mL). Los resultados demostraron que los valores de  $CI_{50}$  de los extractos de corteza fueron los más elevados (220 y 168 µg/mL para Corteza<sub>EtOH</sub> y Corteza<sub>DCM</sub>, respectivamente), resultando ser los menos efectivos contra los epimastigotes de todos los extractos evaluados. Se observó que los extractos etanólico de hoja y diclorometánico de madera tuvieron la mayor actividad tripanocida, y de manera especial, el extracto Madera<sub>DCM</sub> que presentó el valor de  $CI_{50}$  más bajo del ensayo, 60 µg/mL, del mismo orden de magnitud que el obtenido para el extracto de madera de *A. subovata* y del mismo orden de magnitud que el obtenido para el Benznidazol (10 µg/mL). La caracterización fitoquímica de este extracto se encuentra en desarrollo, hasta el momento se han caracterizado alcaloides del tipo de las cantinonas como los posibles responsables de la actividad del extracto (Martínez y col., 2009).

En general, se observó, al igual que lo sucedido con la actividad antioxidante, una diferencia de actividades entre los extractos de las especies pertenecientes a la familia Simaroubaceae (géneros *Castela* y *Picrasma*) y Picramniaceae (géneros *Alvaradoa* y *Picramnia*), siendo los primeros los más activos, a excepción del extracto de madera de *A. subovata*. Esta diferencia de actividad puede también atribuirse a la diferente composición química reportada para los géneros *Alvaradoa* y *Picramnia* en relación al resto de los géneros de la familia Simaroubaceae *sensu* Engler (Jacobs, 2003). Muchos autores coinciden en afirmar que la actividad antimalárica, y antiparasitaria en general, atribuida a distintas especies de esta familia Simaroubaceae se debe a la presencia de cuasinoides (Spencer y col., 1947; Moretti y col., 1994; François y col., 1998; Kim y col., 2000), aunque se encuentra en discusión el papel de los alcaloides del tipo de los β-carbónicos y de las cantinonas reportados para especies de esta familia (Sanchez y Comin, 1971; Barbetti y col., 1987, 1990; Njar y col., 1993; Rivero-Cruz y col., 2005; Chua y col., 2011).

### ***Actividad biológica de los extractos de C. tweedii.***

*C. tweedii* es una especie nativa de la provincia de Santa Fe de la cual no existen publicaciones científicas acerca de sus potenciales biológicos ni de la composición química de sus extractos. Tradicionalmente la infusión de sus hojas y corteza es utilizada en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, diarreas y fiebres intermitentes. Sin embargo, no existen publicaciones que avalen su uso medicinal. Durante el transcurso de este trabajo de tesis se observó que los extractos de *C. tweedii* poseen actividad depuradora de radicales libres, principalmente el extracto etanólico de hoja, que podría estar relacionada, al menos en parte, con su uso tradicional. Además los extractos diclorometánicos de hoja, corteza y madera demostraron tener actividad tripanocida superando en todos los casos el 60% de inhibición del crecimiento de los parásitos. Por tales motivos se seleccionó esta especie para continuar con la búsqueda de actividad biológica y realizar la caracterización fitoquímica de los extractos que resultaran activos.

### ***Actividad tripanocida***

Los extractos diclorometánicos y metanólicos de hoja, corteza y leño de *C. tweedii* demostraron poseer actividad tripanocida frente a epimastigotes de *T. cruzi* a la concentración ensayada. Los extractos diclorometánicos fueron, en general, más activos que los metanólicos, los primeros superaron en todos los casos el 60% de inhibición del crecimiento de los parásitos, siendo el más activo el extracto diclorometánico de madera que alcanzo el 78% de inhibición. Entre los extractos metanólicos, el extracto de hoja mostró muy buena actividad, superando el 75% de inhibición del crecimiento. Debido a los resultados obtenidos con ambos extractos, Madera<sub>DCM</sub> y Hoja<sub>MeOH</sub>, estos fueron considerados para continuar hacia la siguiente fase de evaluación que comprende el cálculo de la concentración inhibitoria, la evaluación de la citotoxicidad y el cálculo del índice de selectividad, etapa que se encuentra actualmente en desarrollo.

### ***Actividad insecticida***

La prospección de nuevas fuentes de pesticidas botánicos a sufrido un auge en las últimas décadas debido, no sólo al rápido desarrollo de resistencia por parte de las distintas plagas, sino también por la necesidad de utilizar productos menos tóxicos y mas ecológicos en el control de plagas (Martinez y col., 2013b). Las estrategias para la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad insecticida incluyen el estudio de plantas pertenecientes a familias utilizadas tradicionalmente con esa finalidad (Philogene y col., 2005). Entre estas, la familia Simaroubaceae ha demostrado tener propiedades insecticidas: el leño de *Q. amara* constituyó uno de los insecticidas botánicos más utilizados hasta la aparición de los productos sintéticos (Metcalf y col., 1951; Polonsky, 1973). En nuestro país, el leño de *P. crenata* ha sido utilizado como sustituto de *Q. amara* por sus propiedades insecticidas (Di Sapio y col., 2012). Además existen numerosos informes reportando actividad anti-alimentaria (Mancebo y col., 2000), e insecticida de extractos de especies pertenecientes a la familia (Leskinen y col., 1984;

Latif y col., 2000; Rodriguez y col., 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la actividad insecticida de los extractos diclorometánicos y metanólicos de hojas, cortezas y leños de *C. tweedii*, sobre la mosca de la fruta, *C. capitata*, importante plaga para la producción frutihortícola en nuestro país.

El estudio de la actividad insecticida de los extractos de *C. tweedii* permitió obtener resultados sobre los efectos letales y subletales en moscas adultas y larvas neonatas de *C. capitata* mediante el empleo de diferentes bioensayos y metodologías de laboratorio. Así, mediante el método de exposición al alimento tratado (EAT) se pudo evaluar el efecto de los extractos sobre las larvas al ingerir el alimento y al hallarse en contacto con el mismo. En este caso, los extractos metanólicos presentaron la mayor actividad con una  $CE_{50}$  de 0,7 y 19,2  $\mu\text{g/mL}$  para los extractos de hoja y corteza respectivamente. De los extractos diclorometánicos, sólo el extracto de hoja mostró actividad significativa ( $CE_{50}= 62 \mu\text{g/mL}$ ). Mediante el método de exposición en papel de filtro impregnado, se pudo evaluar el efecto inhalatorio de los extractos sobre los insectos adultos. En este caso, los extractos más activos fueron los diclorometánicos, siendo muy activo el extracto diclorometánico de madera, el cual mostró un 95% de mortalidad de los insectos a las 5 horas de ensayo. Además, este extracto manifestó un marcado efecto de volteo. Esta característica se presenta en algunos insecticidas de acción demostrada de las familias de los Piretroides y Neonicotenoides (Alzogaray, 1997). Es probable que la menor respuesta de los extractos metanólicos o la mayor respuesta de los extractos diclorometánicos en los bioensayos por inhalación se deba a la volatilidad de cada extracto; los compuestos menos volátiles, presentes en mayor proporción en los extractos metanólicos, tendrían disminuída su acción por inhalación pero demostraron tener una potente actividad insecticida cuando son ingeridos por las larvas. Los efectos subletales observados fueron variados, los extractos metanólicos produjeron alteraciones en el ciclo vital con demoras significativas en el desarrollo de los insectos. Se observó un 92% de alargamiento de la etapa larval respecto del control en el tratamiento con el extracto metanólico de hoja. Este alargamiento en el ciclo vital ocasionaría escaso número de generaciones del insecto en una situación a campo y provocaría una disminución en la densidad poblacional, disminuyendo así el daño económico al cultivo. Por otro lado, los extractos diclorometánicos produjeron una reducción del tiempo de pupariación con respecto al control, esta precocidad en la metamorfosis de los insectos da lugar a adultoides inviables. También se observaron otros efectos subletales como la ocurrencia de alteraciones morfológicas, pupas de tamaño considerablemente menor y adultos que no pudieron emerger por completo de sus puparios.

Los bioensayos de laboratorio son el paso previo y necesario entre la confirmación de la actividad insecticida de un principio activo o de un extracto y el posterior diseño de una formulación eficaz. Se requerirá de ensayos a semicampo y campo para ajustar dosis y corroborar con precisión la dinámica de todos los componentes que conformen un determinado agrosistema. Toda empresa que pretenda formular un plaguicida debe presentar ante SENASA



la información sobre sus características físicas y químicas, datos toxicológicos y los resultados obtenidos en los ensayos de eficacia realizados en laboratorio, como primera instancia para lograr su registro definitivo y poder comercializarlo (Clemente, 2007). Una alternativa es contribuir al desarrollo de formulaciones comerciales aplicables a plagas en un marco de un sistema de Manejo Integrado de Plagas, cuyo propósito es el empleo de principios activos de bajo impacto ambiental. Cabe destacar también que la posibilidad de utilizar una especie vegetal autóctona y preparar sus extractos de forma artesanal para combatir plagas es bienvenido en fincas de pequeños agricultores, con menores recursos económicos, debido a su bajo costo de obtención. Países Latinoamericanos y Asiáticos con recursos económicos limitados han adoptado esta alternativa con éxito (Ocampo y Mora, 2010).

### ***Caracterización fitoquímica de los extractos activos de C. tweedii.***

Se conocen aproximadamente unas 15 especies pertenecientes al género *Castela* Turpin, todas ellas habitan en América tropical y templada (Mabberley, 1997). Los reportes existentes acerca de la composición química de extractos de especies del género hacen referencia, en su mayoría, al aislamiento e identificación de cuasinoides (Chaudhuri y Kubo, 1992; Kubo y col., 1993; Grieco y col., 1994, 1995, 1999). Otros tipos de compuestos reportados incluyen esteroides (Kubo y col., 1992; Grieco y col., 1999) y cumarinas (Jacobs y col., 2007). Esta es la primera investigación realizada sobre la composición química y actividad biológica de *C. tweedii*.

Se identificó  $\beta$ -sitosterol, por CCD y por cromatografía en fase gaseosa frente al patrón de referencia comercial, en el extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. Se identificó también escopoletina en el mismo extracto mediante CCD y CLAE acoplada a detector UV/DAD. La presencia de escopoletina y  $\beta$ -sitosterol en extractos de *Castela tweedii* no había sido reportada previamente. El análisis del extracto diclorometánico de madera por CCD y CLAE con detector UV/DAD permitió, además, caracterizar otras cumarinas en este extracto. La escopoletina y las cumarinas en general han demostrado poseer diversas actividades biológicas, entre ellas, actividad anti-alimentaria en lepidópteros (Susurluk y col., 2007), deterrente (Baskar y col., 2010), y antiparasitaria frente a *Plasmodium falciparum* (Oketch-Rabah, 2000) y frente a promastigotes de *Leishmania sp.* (Ferreira y col., 2010). Por otro lado, también se ha reportado actividad anti-alimentaria (Chandramu y col., 2003; Broussalis y col., 2010), y antihelmíntica (Deepak y col., 2002) entre otras, para el  $\beta$ -sitosterol. La actividad insecticida que presentó el extracto diclorometánico de madera frente a *Ceratitis capitata* durante el ensayo de exposición en papel de filtro impregnado podría deberse a la presencia tanto del  $\beta$ -sitosterol como de la escopoletina o de las restantes cumarinas presentes en el extracto o a un efecto sinérgico de los mismos. La actividad tripanocida registrada para este extracto puede también correlacionarse con las cumarinas y el  $\beta$ -sitosterol presentes en el extracto. Las referencias bibliográficas reconocen, además, a los cuasinoides y/o alcaloides

como los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria de los extractos de otras especies de Simaroubaceae (Okano y col., 2000; Rivero-Cruz, 2005). La presencia de alcaloides y cuasinoides en este extracto no debe descartarse, debido a que, durante el análisis fitoquímico desarrollado se observaron bandas con características de revelado propias de cuasinoides y alcaloides, como fue demostrado en la sección de resultados. Más aún, se observó un pico minoritario por CLAE-UV/DAD cuyo espectro UV coincidió con el del patrón de referencia de harmano (alcaloide  $\beta$ -carbonílico) (Fig.150). El análisis fitoquímico del extracto diclorometánico de madera continúa en desarrollo, con la utilización de métodos de extracción y sistemas cromatográficos más específicos para la detección y caracterización de cuasinoides y alcaloides.

En el perfil cromatográfico del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*, obtenido por CCD, se observó prevalencia de bandas que, por sus características de revelado, corresponderían a compuestos polifenólicos. Fueron identificados ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico y rutina por comparación de los tr y de los espectros UV, obtenidos por CLAE-UV/DAD, con los de los respectivos patrones de referencia comercial. Además, se caracterizaron, por coincidencia de sus espectros UV con patrones de referencia, taninos hidrolizables, flavonas, flavonoles y un isómero del ácido clorogénico. La presencia de polifenoles en las hojas de *C. tweedii* también fue observada en los estudios histoquímicos realizados. La tinción de cortes transversales de hojas de *C. tweedii* con solución de  $\text{FeCl}_3$  acuosa permitió detectar la presencia de taninos en el parénquima en empalizada de las mismas (Fig. 66A). Los taninos son los metabolitos secundarios más abundantes producidos por las plantas, y pueden constituir desde un 5 a un 10% del peso seco de las hojas de ciertas familias botánicas. Están involucrados en la defensa de las hojas frente a insectos herbívoros mediante un efecto de deterrencia y/o toxicidad (Barbehenn y Constabel, 2011). Las propiedades biológicas asociadas a los polifenoles vegetales van desde actividad antioxidante (Rice-Evans y col., 1995; Kähkönen y col., 1999; Soong y Barlow, 2006), antiinflamatoria (Harborne y Williams, 2000), bactericida (Hatano y col., 2005), hasta insecticida (Salunke y col., 2005). Se encuentra en discusión si la actividad insecticida atribuida a los taninos es debida a un efecto de deterrencia, de inactivación de proteínas en el estomago del insecto o por toxicidad (Barbehenn y Constabel, 2011). La rutina, además de una potente actividad antioxidante posee probada toxicidad sobre insectos adultos y huevos de distintas especies de coleópteros (Salunke y col., 2005). Existen trabajos reportando la actividad *in vitro* del ácido gálico y ésteres del mismo sobre cepas de *P. falciparum* (Horgen y col., 1997) y frente a *Leishmania sp.* (Kolodziey y Kiderlen, 2005). Por lo tanto, las actividades reportadas para los taninos y para la rutina y flavonoides en general, sugerirían su participación en las actividades encontradas para el extracto metanólico de hojas.



El análisis morfoanatómico, ecológico, histoquímico y fitoquímico realizado de las hojas, cortezas y leños de las especies nativas argentinas de la Familia Simaroubaceae nos permitió confeccionar la siguiente clave diacrítica. En dicha clave se presentan caracteres comunes y diferenciales que facilitarían la delimitación e identificación de los géneros y de las especies en estudio:

*Clave diacrítica para la determinación de las especies nativas*

*Argentinas de SIMAROUBACEAE*

SIMAROUBACEAE

Árboles de variado porte con hojas pinnaticompuestas que habitan en las Provincias de las Yungas y Paranaense, o arbustos perennifolios con espinas que habitan en las Provincias del Chaco occidental, del Espinal y Pampeano. Leño con elementos del vasos con placa de perforación simple y puntuaciones areoladas alternas; traqueidas y fibrotraqueidas vasicéntricas. Cortezas y leños amargos.

**A**-Especies presentes en Provincias del Chaco y del Espinal. Arbustos espinosos perennifolios de hoja simple. Corteza y leño con cuasinoides. Fibras de paredes fuertemente engrosadas como elemento predominante en sus leños.

**B**-Especie xerófita. La corteza presenta de 2 a 7 peridermis. Radios floemáticos con ensanchamiento distal. La hoja muestra epidermis con pelos simples y cutícula gruesa. Hoja hipoestomática con 460 estomas/mm<sup>2</sup>. Se observa hipodermis adaxial y abaxial. El mesófilo es isolateral. Leño de porosidad difusa a semicircular, vasos con disposición racemiformes de 3 a 5 elementos. Elementos del vaso cortos de aprox. 185 µm de longitud y diámetro pequeño, dispuestos 210 x mm<sup>2</sup>. Fibrotraqueidas y fibras libriformes de aprox. 750 µm de longitud de paredes muy engrosadas. Presencia de traqueidas con engrosamiento helicado. Radios de 1, 5 a 7 seriados con abundantes drusas de oxalato de calcio de gran tamaño-----

-----**Castela coccínea.**

**BB**-Especie xerófita. La corteza presenta 1 a 2 peridermis. Radios floemáticos con ensanchamiento distal. La hoja muestra epidermis con pelos simples y cutícula gruesa. Hoja hipoestomática con 355 estomas/mm<sup>2</sup>. Se observa hipodermis adaxial y abaxial. El mesófilo es dorsiventral. Leño de porosidad difusa a semicircular. Vasos con disposición racemiformes de 3 a 5 elementos. Elementos del vaso cortos de aprox. 200 µm de longitud y diámetro pequeño, dispuestos 275 x mm<sup>2</sup>. Fibrotraqueidas y fibras libriformes de aprox. 900 µm de longitud de paredes

fuertemente engrosadas. Presencia de traqueidas vasicéntricas. Radios de 1 a 3 seriados sin drusas de oxalato de calcio.-----*Castela tweedii*.

**AA-**Especies presentes en Provincias Paranaense y Pampeana. Árboles de gran porte, hojas pinnaticompuestas. Corteza y leño con cuasinoides. Fibras no septadas y fibrotraqueidas de paredes delgadas como elemento predominante en sus leños. Presencia de estructuras secretoras internas.

**C-**Especie mesófito. La corteza presenta 1 peridermis no exfoliante. Radios floemáticos de 1, 5 a 7 seriados. La hoja muestra epidermis con cutícula gruesa y estriada. Pelos simples uni y pluricelulares y pelos glandulares. Epidermis abaxial con glándulas pluricelulares. Hoja hipoestomática con 220 estomas/mm<sup>2</sup>. El mesófilo es dorsiventral. El leño presenta porosidad anular uniforme, vasos grandes solitarios y medianos múltiples de 2 a 6 elementos. Elementos del vaso de aprox. 300 µm de longitud dispuestos 30 x mm<sup>2</sup>. Fibras libriformes cortas de aprox. 450 µm de longitud y largas de aprox. 850 µm de paredes medianamente engrosadas. Radios de 4 a 10 seriados. Se observan cavidades secretoras.-----*Ailanthus altissima*.

**CC-** Especie mesófito. La corteza presenta 5 a 7 peridermis. Radios floemáticos de 1 a 7 seriados muy torcidos y con cristales poliédricos de oxalato de calcio. La hoja muestra epidermis con cutícula fina y ligeramente estriada. Escasos pelos simples unicelulares. Hoja hipoestomática con 270 estomas/mm<sup>2</sup>. El mesófilo es dorsiventral. Nervio medio con cavidad secretora. El leño presenta porosidad difusa con tendencia a anular, vasos medianos múltiples radiales de 3 a 4 elementos. Elementos de los vasos de aprox. 280 µm de longitud dispuestos 40 x mm<sup>2</sup>. Fibras libriformes de aprox. 900 µm de longitud de paredes medianamente engrosadas. Radios de 1 a 5 seriados. Parénquima de radio con drusas y cristales poliédricos de oxalato de calcio. Se observan cavidades secretoras-----*Picrasma crenata*.

**AAA-** Especies presentes en Provincias de las Yungas, Paranaense y del Espinal. Árboles de bajo porte. Hojas pinnaticompuestas. Corteza y leño con antraquinonas. Leño con parénquima axial escaso o nulo. Fibras septadas y no, y fibrotraqueidas de paredes delgadas como elemento predominante de sus leños. Presencia de estructuras secretoras externas.

**D-**Especie mesófito. La corteza presenta 1 peridermis exfoliante. Radios 1 a 3 seriados sin ensanchamiento distal. La hoja muestra epidermis con cutícula delgada. Ambas epidermis muestran papilas desarrolladas. Presenta pelos simples



unicelulares. Hoja hipoestomática, estomas hundidos, 150 estomas/mm<sup>2</sup>. El mesófilo es dorsiventral. El leño presenta porosidad difusa no uniforme. Vasos medianos múltiples de distribución radial y oblicua. Elementos del vaso de aprox. 300 µm de longitud dispuestos 30 x mm<sup>2</sup>. Fibrotraqueidas y fibras libriformes de aprox. 700 µm de longitud de paredes medianamente engrosadas. Presencia de traqueidas vasicéntricas. Presencia de fibras septadas. Radios de 1-3 seriados. Parénquima axial escaso o nulo.-----*Alvaradoa subovata*.

**DD-** Especie mesófito. La corteza presenta 1 peridermis exfoliante. Radios corticales 1 a 2 seriados con ensanchamiento distal. La hoja muestra epidermis con cutícula medianamente gruesa con tricomas simples unicelulares. La epidermis abaxial presenta glándulas pluricelulares. Hoja hipoestomática, 290 estomas/mm<sup>2</sup>. El mesófilo es dorsiventral. El leño presenta porosidad difusa uniforme, vasos medianos múltiples radiales de 2 a 6 y de 6 a 12 elementos. Elementos del vaso de aprox. 400 µm de longitud, dispuestos 25 x mm<sup>2</sup>. Fibrotraqueidas y fibras libriformes de aprox. 600 µm de longitud de paredes medianamente engrosadas. Presencia de traqueidas vasicéntricas. Presencia de fibras septadas. Radios de 1-3 seriados. Parénquima axial escaso o nulo.-----*Picramnia parvifolia*.

**DDD-** Especie mesófito. La corteza presenta 1 peridermis exfoliante. Radios 1 a 3 seriados con ensanchamiento distal. La hoja muestra ambas epidermis con cutícula delgada y lisa, con tricomas simples, unicelulares, y glandulares. Hoja hipoestomática, 260 estomas/mm<sup>2</sup>. El mesófilo es dorsiventral. El leño presenta porosidad difusa uniforme, vasos medianos, múltiples radiales de 4 a 10 y escasos solitarios. Elementos del vaso de aprox. 500 µm de longitud dispuestos 25 x mm<sup>2</sup>. Fibrotraqueidas y fibras libriformes de aprox. 850 µm de longitud de paredes medianamente engrosadas. Presencia de traqueidas vasicéntricas. Presencia de fibras septadas. Radios de 1 y 2 a 3 seriados. Parénquima axial escaso o nulo.-----*Picramnia sellowii*.

Los caracteres obtenidos corroboran la polifilia existente en las Simaroubaceae y aportan nuevos datos que avalan los últimos reordenamientos taxonómicos propuestos para esta familia por Weeber (1936), Cronquist (1981), Fernando y Quinn (1995) y en relación al último sistema de clasificación APG III. Dichos caracteres respaldan la segregación de los géneros *Alvaradoa* y *Picramnia* de la Familia Simaroubaceae propuesta originalmente por Engler (1931).

El análisis micrográfico de las hojas, cortezas y leños es válido para la identificación de las especies nativas y permitirá la realización de controles de calidad de éstas como drogas crudas, evitando adulteraciones o falsificaciones.

El análisis de la capacidad depuradora de radicales libres de los extractos diclorometánicos y etanólicos de hoja, corteza y madera, de las especies estudiadas, nos permitió detectar actividad antioxidante significativa en los extractos etanólicos de cortezas y hojas de todas las especies. Para *A. subovata*, *P. sellowii* y *P. parvifolia* fueron levemente más activos los extractos de corteza que los de hojas. Los compuestos responsables de dicha actividad fueron caracterizados cromatográficamente como antraquinonas y polifenoles. De las especies restantes, *C. coccinea*, *C. tweedii*, *P. crenata* y *A. altissima*, fueron más activos los extractos etanólicos de hoja y los compuestos responsables de la actividad fueron de naturaleza polifenólica, principalmente taninos, ácidos fenilcarboxílicos y flavonoides. La capacidad depuradora de radicales libres encontrada en estos extractos permitiría justificar, en parte, el uso tradicional de dichas especies.

Los extractos diclorometánicos de corteza y leño de *P. crenata* presentaron un alto porcentaje de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Los extractos diclorometánicos de madera de *A. subovata*, de madera de *C. tweedii*, y de hoja de *C. coccinea* fueron también muy activos frente a dicho parásito. Estos extractos son promisorios y deben considerarse para continuar hacia la siguiente fase de evaluación: cálculo de la concentración inhibitoria, evaluación de citotoxicidad y cálculo del índice de selectividad.

Debido a la escasa información reportada sobre la actividad biológica y fitoquímica de *C. tweedii*, se realizó un análisis de sus potenciales actividades biológicas, actividad insecticida y antiparasitaria; y de la composición química de los extractos de esta especie.

Los extractos diclorometánicos y metanólicos de *C. tweedii* exhibieron actividad tripanocida, siendo muy activos los extractos diclorometánico de madera y metanólico de hojas.

El extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii* presentó actividad insecticida frente a *Ceratitis capitata* en los ensayos por exposición al papel de filtro impregnado, donde se evaluó el efecto inhalatorio de los extractos sobre los insectos adultos. Además, este extracto manifestó un marcado efecto de volteo, esta característica se presenta en algunos insecticidas de acción demostrada de las familias de los Piretroides.

Se identificó escopoletina y  $\beta$ -sitosterol en el extracto diclorometánico de madera de *C. tweedii*. La presencia de escopoletina y  $\beta$ -sitosterol en extractos de esta especie no había sido descrita anteriormente. Además, se caracterizaron cumarinas y alcaloides ( $\beta$ -carbonílicos) en el mismo. Las actividades reportadas para  $\beta$ -sitosterol, escopoletina y cumarinas en general, y para los alcaloides, sugerirían su participación en las actividades encontradas para este extracto.

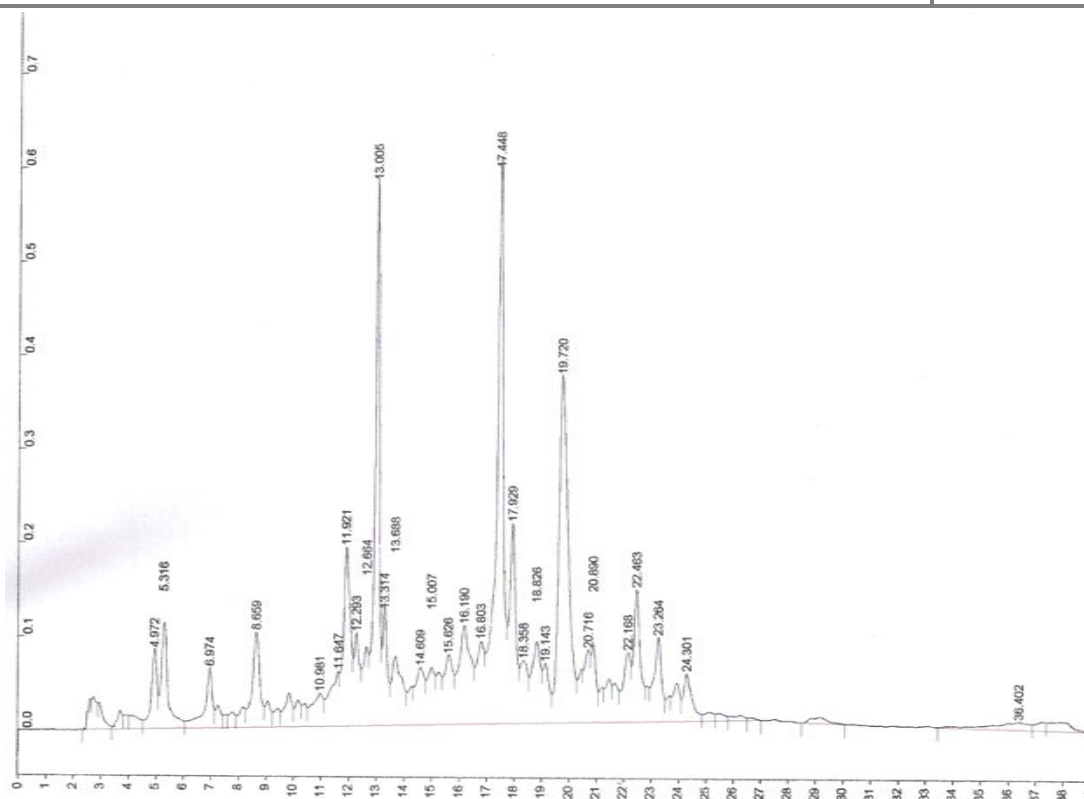
El extracto metanólico de hojas de *C. tweedii* presentó también actividad insecticida frente a *C. capitata* en el método por exposición al alimento tratado (EAT), donde se pudo evaluar el efecto de los extractos sobre las larvas al ingerir el alimento y al hallarse en contacto con el mismo.

En el extracto metanólico de hoja se identificó ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogénico y rutina. No existían reportes previos sobre la presencia de estos compuestos en extractos de *C. tweedii*. Además, se caracterizaron de taninos, flavonas y flavonoles en dicho extracto.

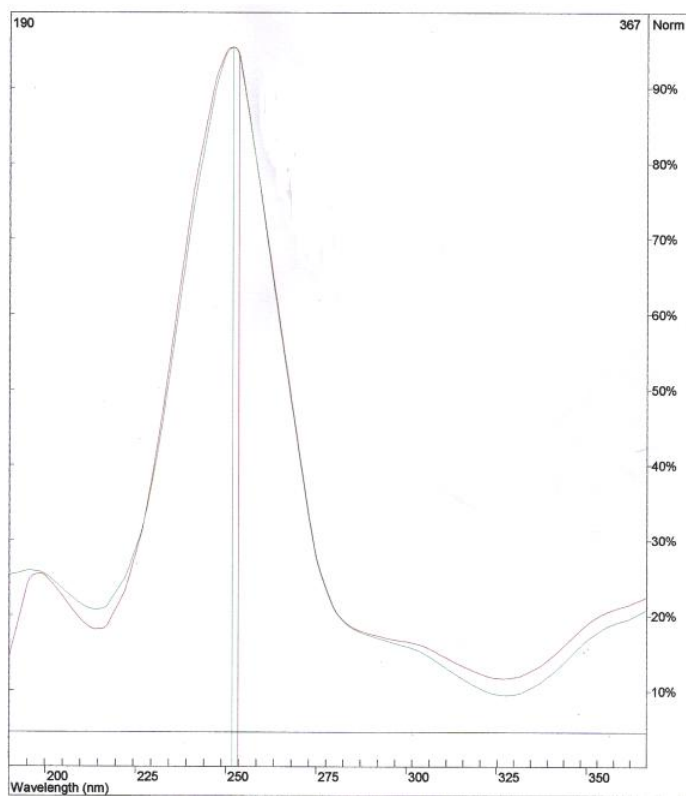
La presencia de polifenoles en las hojas de *C. tweedii* había sido detectada también en los estudios histoquímicos realizados.

Las actividades tripanocida e insecticida, así como también el uso popular de las infusiones de *C. tweedii* podrían ser justificadas, al menos en parte, por la presencia de estos compuestos químicos en el extracto.

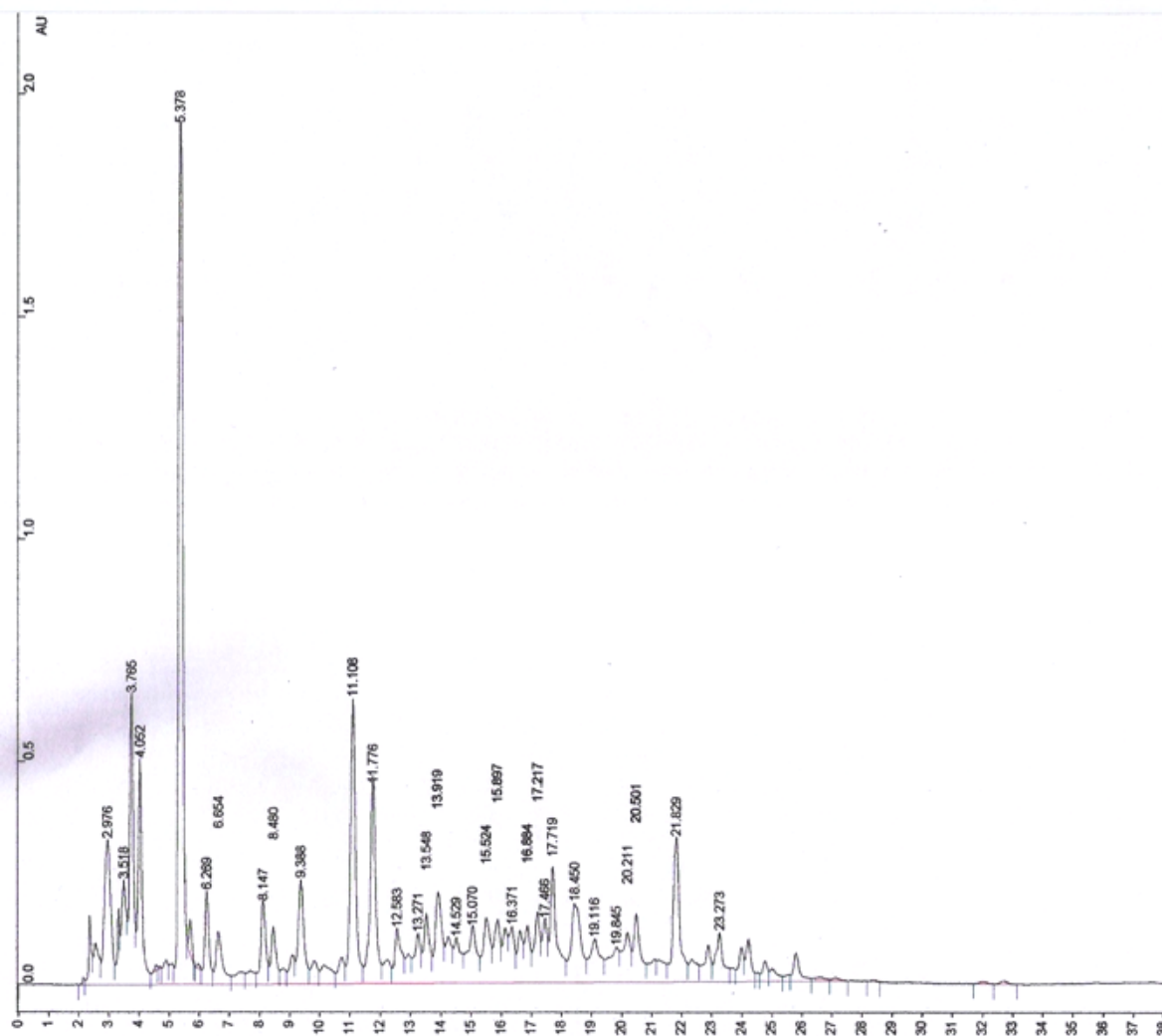
Las actividades halladas para los extractos de *C. tweedii* y el estudio fitoquímico realizado contribuyen al conocimiento de nuestra flora medicinal. Sus extractos y/o principios activos podrían ser utilizados como potenciales agentes terapéuticos en enfermedades antiparasitarias y/ o como pesticidas de origen botánico para el control de plagas de importancia agrícola.



**Figura 167:** Perfil cromatográfico obtenido por CLAE en el sistema II de la fracción  $H_{AcOEt}$  del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*.

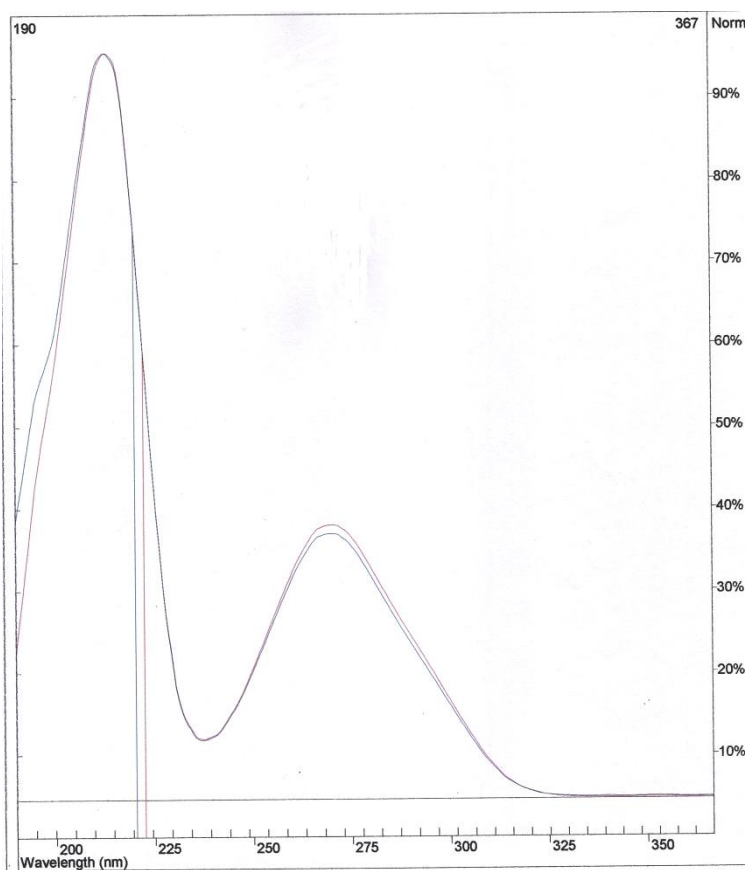


**Figura 168:** Espectro UV correspondiente al pico de tr: 19.7 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de ácido elágico (tr: 19.8 min.)

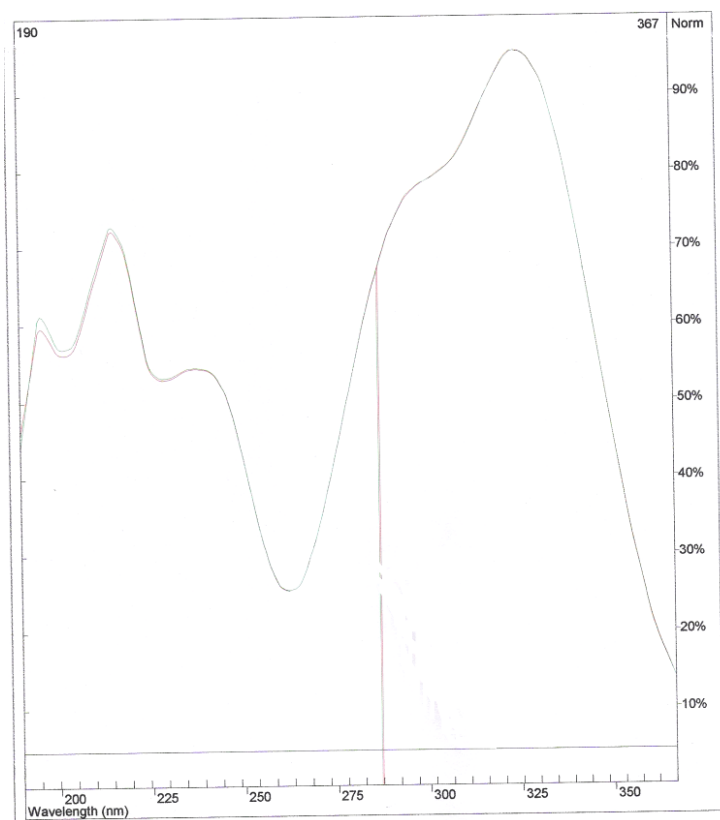


**Figura 169:** Perfil cromatográfico obtenido por CLAE en el sistema II de la fracción H<sub>Acuosa</sub> del extracto metanólico de hojas de *C. tweedii*.

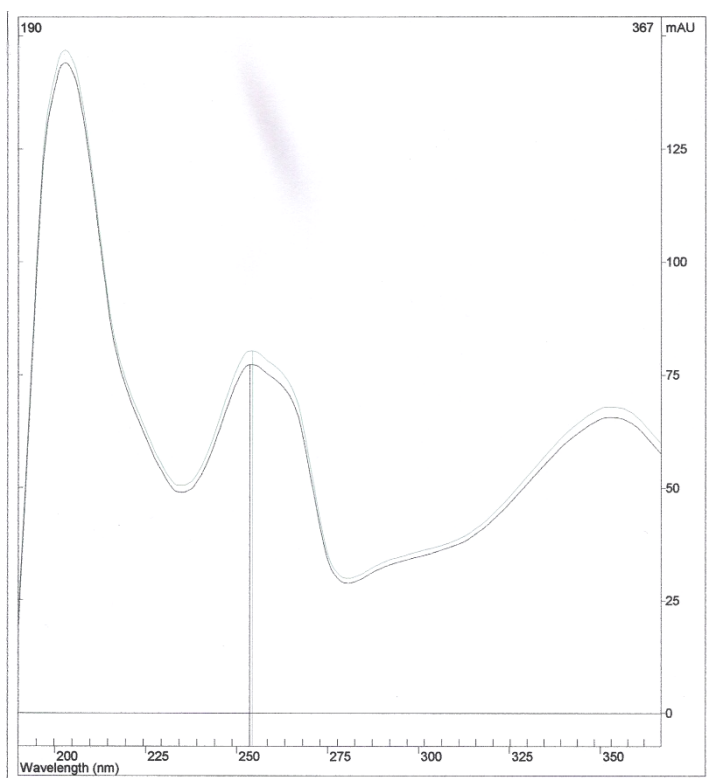




**Figura 170:** Espectro UV correspondiente al pico de tr: 5.3 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de ácido gálico (tr: 5.5 min.)



**Figura 171:** Espectro UV correspondiente al pico de tr: 11.1 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de ácido clorogénico (tr: 11,6 min.)



**Figura 172:** Espectro UV correspondiente al pico de tr: 20.5 min. superpuesto al del patrón de referencia comercial de rutina (tr: 19,5 min) .

- Alarcón, D.L.L., Lopez, A., y Motilva, V. (1993). Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta medica*, 59(6), 497-501.
- Alcalde, M. T., y Pozo, A. D. (2007). Vinagre de quassia como tratamiento cosmético natural contra los piojos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 26 (3), 132-133.
- Alzogaray, RA, Zerba, E N. (1997). Incoordination, paralisys and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92 (3), 431-435.
- Amarowicz, R., Żegarska, Z., Rafałowski, R., Pegg, R. B., Karamać, M., y Kosińska, A. (2009). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. *European journal of lipid science and technology*, 111(11), 1111-1117.
- Ang, H. H., Chan, K. L., y Mak, J. W. (1995). *In vitro* antimalarial activity of from *Eurycoma longifolia* against Malaysian chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates. *Planta Medica*, 61, 34-38
- Arambarri, A. M., Freire, S. E., Colares, M. N., Bayón, N. D., Novoa, M. C., Monti, C., y Stenglein, S. A. (2008). Anatomía foliar de arbustos y árboles medicinales de la Selva Misionera de la provincia Paranaense (Argentina): Parte 2. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 43(1-2), 31-60.
- Arambarri, A. M., Freire, S. E., Bayón, N. D., Colares, M. N., Monti, C., Novoa, M. C., y Hernández, M. P. (2009). Morfoanatomía foliar de árboles medicinales de la Provincia Biogeográfica de las Yungas (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 342-379.
- Arambarri, A. M., Novoa, M. C., Bayón, N. D., Hernández, M. P., y Monti, M. C. S. C. (2011). Anatomía foliar de arbustos y árboles medicinales de la región chaqueña semiárida de la Argentina. *Dominguezia*, 27, 5-24.
- Argolo, A C C, Sant'Ana, A E G, Pletsch, M, Coelho, L C B. (2004). Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*. 95, 229–233.
- Arias, Thomas D. (1999). Glosario de medicamentos: Desarrollo, evaluacion y uso. *Organizacion Panamericana de la salud*. Washintong DC.: OPS. 333p. ISBN: 9275323054.
- Bado, S., Mareggiani, G., Amiano, N., Burton, G., y Veleiro, A. S. (2004). Lethal and sublethal effects of withanolides from *Salpichroa origanifolia* and analogues on *Ceratitis capitata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (10), 2875-2878.
- Bailey, I. W., y Tupper, W. W. (1918). Size variation in tracheary cells: I. A comparison between the secondary xylems of vascular Cryptogams, Gymnosperms and Angiosperms. In *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, American Academy of Arts and Sciences, pp. 149-204.
- Barbehenn, R. V., y Constabel, P. C. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72 (13), 1551-1565.

- Barbetti, P., Grandolini, G., Fardella, G., Chiappini, I. (1987). Indole Alkaloids from *Quassia amara*. *Planta Medica* 53: 289-290.
- Barbetti, P., Grandolini, G., Fardella, G., Chiappini, I., y Mastalia, A. (1990). New canthin-6-one alkaloids from *Quassia amara*. *Planta Medica*, 56 (02), 216-217.
- Barbetti, P., Grandolini, G., Fardella, G., y Chiappini, I. (1993). Quassinoids from *Quassia amara*. *Phytochemistry*, 32 (4), 1007-1013.
- Barboza, G E., Cantero J J, Núñez, C, Pacciaroni, A, y Luis Ariza Espinar. (2009) Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*. 34 (1-2), 7-365.
- Barboza, G. (2013). Flora Medicinal de Argentina: Composicion Floristica y Perspectivas para su Conservacion. *Dominguezia*, 29, Suplemento, 7-8.
- Bass, P. (1976). Some functional and adaptive aspects of vessel member morphology. In: *Wood structure in biological and technological research*. P. Baas, A.J. Bolton & D.M. Catling Eds). Leiden Univ. Press, The Hague. Leiden Bot. Series No.3: 157-181.
- Bass, P. (1982). Systematic, phylogenetic, and ecological wood anatomy. History and perspectives. In: *New perspectives in wood anatomy*. P. Baas Ed. Nijhoff/Junk, The Hague-Boston. pp 23-58.
- Baas, P., Werker, E. y Fahn, A. (1983). Some Ecological Trends in Vessel Characters. *IAWA Bulletin*, 4 (2-3), 141-159.
- Baas, P. y Carlquist, S. (1985). A comparison of ecological wood anatomy of the floras of southern California and Israel. *IAWA Bull.* 8, 245-274.
- Baskar, K., Maheswaran, R., Kingsley, S., y Ignacimuthu, S. (2010). Bioefficacy of *Couroupita guianensis* (Aubl) against *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8 (1), 135-141.
- Bernardello, L. M., Stiefkens, L. B., y Piovano, M. A. (1990). Números cromosómicos en dicotiledóneas argentinas. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 26 (3-4), 149-157.
- Bertani, S., Hou"el, E., Bourdy, G., Stien, D., Jullian, V., Landau, I., Deharo, E. (2007). *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 40–42.
- Bhatnagar, S. C., Caruso, A. J., Polonsky, J., y Rodriguez, B. S. (1987). Biologically active quassinoids: synthetic methodology for the conversion of chaparrin into glaucarubolone esters and quassinoid analogs. *Tetrahedron*, 43 (15), 3471-3480.
- Blois, MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P., (1993). The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics. *Chim. Oggi*, 11, 25–28.

- Boodle, L. (1916). A method of macerating fibres. *Bulletin Miscellaneous Inform.* 5, 108-110.
- Bourdy, G., Oporto, P., Gimenez, A., Deharo, E. (2004). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J. Ethnopharmacol.* 93, 269-277.
- Bory, G., y Maczulajtys, C. (1978). Morphologie, anatomie et developpement des glandes foliaires chez l'*Ailanthus glandulosa* Desf. (Simarugacees). *Rev. Gen de bot.*, 85, 137-156.
- Bory, G. y Clair-Maczulajtys, D., (1990). Importance of foliar nectarines in the physiology of tree of heaven (*Ailanthus glandulosa* Desf., Simaroubaceae). *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, *Letters bot.* (2/3), 139-155.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M.W., Fay, M.F., Reveal, J.L., Soltis, D.E., Soltis P.S., Stevens, P.F., Anderberg, A.A., Moore, M.J., Olmstead, R.G., Rudall, P.J., Sytsma, K.J., Tank, D.C., Wurdack, K., Xiang, J.Q.Y. y Zmarzty, S. (2009). The angiosperm phylogeny group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105-121.
- Broussalis, A. M., Clemente, S., y Ferraro, G. E. (2010). *Hybanthus parviflorus* (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant. *Crop Protection*, 29 (9), 953-956.
- Bruneton, J., y Barton, D. H. R. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Ed. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España.
- Cabral, J. A.; Mc Chesney, J. D.; Milhous, W. K.; A (1993). New Antimalarial Quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products*, 56 (11), 1954-1961.
- Cabrera, A.L., (1971). Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Soc. Argentina de Botánica*, 14 (1-2), 1-41.
- Cabrera, A. L. (1994). Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería, Tomo II, Fascículo 1: Regiones fitogeográficas Argentinas. ACME, Buenos Aires.
- Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacol.*, 100 (1), 131-134.
- Camacho, M. R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Solis, P. N., Marshall, S. J., Ghazanfar, S. A. (2003). Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol.* 89, 185 - 191.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *T. cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev. Med. Trop. Sao Paulo*, 6, 220-224.



- Carlquist, S. (1966). Wood anatomy of Compositae a summary, with comments on factors controlling wood evolution. *Aliso*, 6, 25-44.
- Carlquist, S. J. (1975). *Ecological strategies of xylem evolution*. Univ of California Press. Los Angeles, California. pp 174-223.
- Carlquist, S. J. (1977). Ecological factors in wood evolution: a floristic approach. *American Journal of Botany*, 64 (7), 887-896.
- Carlquist, S. J. (1980). Further concepts in ecological wood anatomy, with comments on recent work in wood anatomy and evolution. *Aliso*, 9 (4), 499-553.
- Carlquist, S. y Hoekman, D. (1985). Ecological wood anatomy of the woody southern flora. *IAWA Bull.* 6, 319-347.
- Carlquist, S. (1988). *Comparative Wood Anatomy: Sistematic Ecological, and Evolutionary Aspects of Dicotyledon Wood*. Springer-Verlag Eds., Berlin. 460p
- Carlquist, S. (2001). *Comparative Wood Anatomy: Systematic, Ecological, and Evolutionary Aspects of Dicotyledon Wood*. 2<sup>da</sup> edición, Springer Ed., Berlin. pp 9-34.
- Carrizo, E. D. V., Palacio, M. O., y Roic, L. D. (2005). Uso medicinal de algunas especies nativas en Santiago del Estero (República Argentina). *Dominguezia*, 21(1), 25-32.
- Castro, J. A., Montalto de Mecca, M., y Bartel, L. C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology*, 25 (8), 471-479.
- Céspedes, C.L., y Alarcon, J. (2011). Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (3), 175-181.
- Chan, K. L., O'Neill, M. J., Phillipson, J. D., y Warhurst, D. C. (1986). Plants as Sources of Antimalarial Drugs. Part 31 *Eurycoma longifolia*. *Planta Medica*, 52 (02), 105-107.
- Chan, K. L., Lee, S., Sam, T. W., y Han, B. H. (1989). A quassinoid glycoside from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry*, 28 (10), 2857-2859.
- Chandramu, C., Manohar, R. D., Krupadanam, D. G., y Dashavantha, R. V. (2003). Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy research*, 17 (2), 129-134.
- Chaudhuri, S. K., y Kubo, I. (1992). Two quassinoid glucosides from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry*, 31(11), 3961-3964.
- Chua, L. S., Amin, N. A. M., Neo, J. C. H., Lee, T. H., Lee, C. T., Sarmidi, M. R., y Aziz, R. A. (2011). LC-MS/MS-based metabolites of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) in Malaysia (Perak and Pahang). *Journal of Chromatography B*, 879 (32), 3909-3919.
- Cieślik, E., Greda, A., Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem.*, 94, 135-142.
- Clair-Maczulajtys, D., y Bory, G. (1983). Les nectaires extrafloraux pedicelles chez l'*Ailanthus glandulosa*. *Canadian Journal of Botany*, 61(3), 683-691.

- Clair-Maczulajtys, D., y Bory, G. (1985). Lipids from the glandular trichome of *Ailanthus altissima*. *Phytochemistry*, 24 (7), 1599-1600.
- Clark, E. P. (1937). Quassin. I. The preparation and purification of quassin and neoquassin, with information concerning their molecular formulas. *Journal of the American Chemical Society*, 59 (5), 927-931.
- Clemente, S. (2007). Actividad insecticida de extractos de especies vegetales sobre plagas clave de la agricultura. Tesis doctoral. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Argentina. pp20-45.
- COSAVE: Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur. (2011). Hoja de datos sobre organismos cuarentenarios para los países miembros del Cosave Ficha cuarentenaria: *Ceratitis capitata* Wied (Diptera: Tephritidae). Disponible en: [www.cosave.org](http://www.cosave.org).
- Coura, J. R., y de Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24.
- Cragg, G. y Newman, D. (2001). Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology*. 39 (1), 8-17.
- Cronquist, A. (1968). The evolution and classification of flowering plants. *The evolution and classification of flowering plants*. Thomas Nelson & Sons Ed., Londres. pp 311-321.
- Cronquist, A. (1944a). Studies in the Simaroubaceae I: the genus *Castela*. *J. Arnold Arbor*, 25, 122-128.
- Cronquist, A. (1944b). Studies in the Simaroubaceae-II. The Genus *Simarouba*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 71, (3), 226-234.
- Cronquist, A. (1944c). Studies in the Simaroubaceae III. The genus *Simaba*. *Lloydia*, 7(1), 81
- Cronquist, A. (1944d). Studies in the Simaroubaceae IV. Resume of the American genera. *Brittonia* 5 (2), 128-147.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System Classification. *The Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Curcino-Vieira, I.J; Braz-Filho, R. (2006). Quassinoids: structural diversity, biological activity and synthetis studies. *Studies in Natural Products Chemistry*, (33), 433-492.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Ed. Hemisferio sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 59-60.
- Dahlgren, R. (1980). A revised system of classification of the Angiosperms. *Bot. J. Linn. Soc.* 80, 91-124.
- Dahlgren, G. (1989). The last Dahlgrenogram, system of classification of the dicotyledons in: *Plant taxonomy, phytogeography and related subjects: the Davis and Hedge Festschrift*. Tan, K. (ed.), Edinburgh. pp. 249-260

Daido, M., Fukamiya, N., Okano, M., y Tagahara, K. (1995). Picrasinol D, a new quassinoid from the stem wood of *Picrasma ailanthoides*. *Journal of Natural Products*, 58 (4), 605-608.

Debenedetti, S., Muschietti, L., Van Baren, C., Clavin, M., Broussalis, A., Martino, V. y Steele, J. (2002). *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 80 (2), 163-166.

Deepak, M., Dipankar, G., Prashanth, D., Asha, M. K., Amit, A., y Venkataraman, B. V. (2002). Tribulosin and  $\beta$ -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine*, 9 (8), 753-756.

De Feo, V., De Martino, L., Quaranta, E., y Pizza, C. (2003). Isolation of phytotoxic compounds from Tree-of-Heaven (*Ailanthus altissima* Swingle). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5), 1177-1180.

Desmarchelier, C., Romão, R. L., Coussio, J., Ciccía, G. (1999). Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *J. of Ethnopharmacology*, 67, 69-77.

Di Sapio O, Gattuso S, Gattuso M. (1997). Anatomía de Leños y Cortezas de Tres Especies de Simaroubaceae Empleadas en la Medicina Popular. VI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina. Antigua Guatemala, 6 al 9 Octubre 1997.

Di Sapio, O., Campagna, M., Rodriguez, M., Martinez, M., Cortadi, A., Gattuso, S., y Gattuso, M., (2012). Parámetros micrográficos para la identificación de leño, corteza y hoja de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 172-187

Domínguez, J. A. (1939). Urquiza y Bonpland, antecedentes históricos. La disentería en el Ejército Grande en formación, en 1850. *Trab Inst Bot Farmacol*, 59, 1-19.

Dou, J., Khan, I., Mc Chesney, J., y Burandt, Jr. C. (1996a). Qualitative and quantitative high performance liquid chromatographic analysis of quassinoids in Simaroubaceae plants. *Phytochemical Analysis*. 7, 192-200.

Dou, J., McChesney, J. D., Sindelar, R. D., Goins, D. K., Khan, I. A., y Walker, L. A. (1996b). A new quassinoid from crude quassin-extract of *Quassia amara*. *Pharmaceutical Biology*, 34 (5), 349-354.

Douliot, H, H. (1889). Recherchessur le périderme. *Ann. Des Sci. Nat.* 7eme 1, 325-395.

Dreyer, D. L., Waterman, P. G., y Grundon, M. F. (1983). Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. Academic Press, New York, 215p.

Ellmore, G. S., y Ewers, F. W. (1985). Hydraulic conductance in trunk xylem of elm, *Ulmus americana*. *IAWA Bull.*, 6, 303-307.

Engler, A. (1931). Simarubaceae. En *Die Natürlichen pflanzenfamilien*. Engler, A., y Prantl, K., 2Ed, Band 19<sup>a</sup>, Alemania, 359-405.

- Engler, A. (1964). Syllabus der Pflanzenfamilien. 12a edición. Gebrüder Bornträger Ed. Berlin.
- Esau, K. (1969). The phloem. Handbuch der Pflanzenanatomie. Vol. 2. Gebr. Borntraeger Ed., Berlin, Stuttgart. 505p
- Evans, W.C. (2002). Trease and Evans. Pharmacognosy, WB Saunders. *Edinburgh, London*, pp 214-251.
- Fabris, H. A., (1965). Simaroubaceae, en Cabrera A.L. Flora de la provincia de Buenos Aires, Parte IV. INTA Ed. pp 45-48.
- Fahn, A., y Cutler, D. F. (1992). *Xerophytes*. Gebrüder Borntraeger Ed., Stuttgart, Alemania, 176p.
- Fernando, E., Gadek, P., Quinn, C. (1995) Simaroubaceae, an artificial construct: evidence from *RB CL* sequence variation. *Amer. J. Bot.* 82, 92-103.
- Fernando, E., Quinn, C. (1992). Pericarp anatomy and systematics of the Simaroubaceae *sensu lato*. *Austral. J. Bot.* 40, 263-289.
- Fernando, E., Quinn, C. (1995). Picramniaceae, a new family, and a recircumscription of Simaroubaceae. *Taxon* 44, 177-181.
- Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., de Bilbao, N. V., Nakayama, H., Torres, S., y Fournet, A. (2010). Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. *Phytomedicine*, 17 (5), 375-378.
- Finney, D. J. (1971). Probit analysis. 3rd Ed. Cambridge University Press, New York. pp 31-44.
- Franceschi, V. R., y Horner, H. T. (1980). Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review*, 46 (4), 361-427.
- François, G., Diakanamwa, C., Timperman, G., Bringmann, G., Steenackers, T., Atassi, G., y Vanhaelen, M. (1998). Antimalarial and cytotoxic potential of four quassinoids from *Hannoa chlorantha* and *Hannoa klaineana*, and their structure-activity relationships. *International Journal for Parasitology*, 28 (4), 635-640.
- Fukamiya, N., Okano, M., Miyamoto, M., Tagahara, K., y Lee, K. H. (1992). Antitumor agents, 127. Bruceoside C, a new cytotoxic quassinoid glucoside, and related compounds from *Brucea javanica*. *Journal of natural products*, 55 (4), 468-475.
- Furlan, R., Molina, G., Micheloni, O., Zudenigo, M., y Zacchino, S. (1994). Uso del bioensayo de *Artemia salina* para la detección de productos naturales con actividad biológica de la familia Simaroubaceae. *Anales de SAIPA (Buenos Aires)*, 12, 293-312.
- Gadek, P. A., Fernando, E. S., Quinn, C. J., Hoot, S. B., Terrazas, T., Sheahan, M. C., y Chase, M. W. (1996). Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany*, 802-811.

- Galvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, M.E., Lorente, M.D., Ocete, M.A., Jimenez, J., (1993). Antidiarrhoetic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Medica* 59, 333-336.
- Garlant, H.M., Miranda, D., Grance, L., Bohren, A. y Keller, H (2002). Estructura anatómica de la corteza y diseño del ritidoma de *Cedrela fissilis* Vell. y *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae). *Quebracho* 9, 43-53.
- Gattuso, M.A., Gattuso, S.J. (2002). *Técnicas Histológicas en Material Vegetal*. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR Ed., pp. 62-74.
- Geran, R.I. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep*, 3, 51-61.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., y Dickerson, W.A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69 (4), 487-488.
- Grieco, P.A., Moher, E.D., Seya, M., Huffman, J.C., y Grieco, H.J. (1994). A quassinoid (peninsularinone) and a steroid from *Castela peninsularis*. *Phytochemistry*, 37(5), 1451-1454.
- Grieco, P.A., Vander Roest, J.M., Piñeiro-Núñez, M.M., Campaigne, E.E., y Carmack, M. (1995). Polyandrol, a C-19-quassinoid from *Castela poliantha*. *Phytochemistry*, 38 (6), 1463-1465.
- Grieco, P.A., Haddad, J., Piñeiro-Núñez, M.M., y Huffman, J.C. (1999). Non-quassinoid constituents from the twigs and thorns of *Castela polyandra*. *Phytochemistry*, 51 (4), 575-578.
- Grieve, M. (1996). *A Modern Herbal*. Barnes & Noble Ed., New York, p.166.
- Gu, H.F., Li, C.M., Xu, Y.J., Hu, W.F., Chen, M.H., y Wan, Q.H. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, 41 (2), 208-217.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A., y Sindelar, R.D. (2005). Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2), 173-190.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (1), 1-93.
- Haas, L.F., (1996). Pedanius Dioscorides (born about AD40, died about AD 90). *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 60, 427.
- Halberstein, R. A. (2005). Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*, 15 (9), 686-699.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55, 44-49.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Clarendon Press, Oxford.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J., y Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*. Part 1. Academic Press. New York, 376p.



- Harborne, J.B., y Mabry, T.J. (1982). *The flavonoids: advances in research*. Vol. 65. Chapman and Hall Ed. London. 743p.
- Harborne, J.B. y Williams, C.A. (2000). Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T. O., Shiota, S., Tsuchiya, T., y Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66 (17), 2047-2055.
- Haston, E., Richardson, J. E., Stevens, P. F., Chase, M. W., y Harris, D. J. (2009). The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161 (2), 128-131.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shinizu, M., Morita, M. (1988). Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, 51 (2), 345-348.
- Hegnauer, R. (1983). Chemicals characters and the classification of the Rutales. En P. G. Waterman and M. F. Grundon Eds., *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*, Academic Press, London. pp 401-440.
- Heisey, R.M. (1990). Allelopathic and herbicidal effects of extracts from tree of heaven (*Ailanthus altissima*). *American Journal of Botany*, 662-670.
- Heisey, R. M., y Heisey, T. K. (2003). Herbicidal effects under field conditions of *Ailanthus altissima* bark extract, which contains ailanthone. *Plant and Soil*, 256 (1), 85-99.
- Hernandez-Medel, M.R., Pereda-Miranda, R. (2002). Cytotoxic anthraquinone derivatives from *Picramnia antidesma*. *Planta Medica*. 68, 556 - 558.
- Hickey, J. (1973). Classification of the architecture of Dicotyledons leaves. *American Journal of Botany* 60, 17-33, traducido por Zardini E. (1974). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 16, 1-26.
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H., Barnett LC. (eds.). (1990). *Index Herbariorum*. New York Botanical Garden Ed., New York.
- Horgen, F. D., Madulid, D. A., Angerhofer, C. K., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., y Farnsworth, N. R. (1997). Isolation of gallic acid esters as antiplasmodial constituents of *Swintonia foxyworthyi* (Anacardiaceae). *Phytomedicine*, 4 (4), 353-356.
- Howard, T. G., Gurevitch, J., Hyatt, L., Carreiro, M., y Lerda, M. (2004). Forest invasibility in communities in southeastern New York. *Biological Invasions*, 6 (4), 393-410.
- Hu, S. Y. (1979). *Ailanthus*. *Arnoldia*, 39 (2), 29-50.
- Ipohorski, M., Marrapodi, M. (1981). Interpretación de imágenes en Microscopia Electrónica de Barrido. Comisión Nacional de Energía Atómica Argentina. pp. 1-21.
- Issa, A.Y., Volate, S.R., Wargovich, M.J. (2006). The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 405-419.

- Jaccard, P. (1921). Nombre et dimensions des rayons medullaires chez *Ailanthus glandulosa*. *Bull. Soc. Vaudoise Sc. Nat.* 54, 253-262.
- Jacobs, H. (2003). Comparative phytochemistry of *Picramnia* and *Alvaradoa*, genera of the newly established family Picramniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (7), 773-783.
- Jacobs, H., Simpson, D.S., y Reynolds, W.F. (2007). Quassinoids and a coumarin from *Castela macrophylla* (Simaroubaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (1), 42-44.
- Jadin, F. (1901). Contribution à l'étude des Simarubacées. *Annales des Sciences Naturalles Botanique*. Paris, Série 8. 13, 201-304.
- Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Hirai, N., y Ohigashi, H. (2001). Quassinoids from *Eurycoma longifolia* as plant growth inhibitors. *Phytochemistry*, 58 (6), 959-962.
- Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kawanaka, M., Kawanaka, H., Gasquet, M., y Ohigashi, H. (2002). In vitro anti-tumor promoting and anti-parasitic activities of the quassinoids from *Eurycoma longifolia*, a medicinal plant in Southeast Asia. *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (1), 55-58.
- Johnson, L.T. (2001). Antioxidants and antitumor properties. In: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (Eds), Antioxidants in Food. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp: 100-123.
- Junikka, L. (1994). Survey of English microscopic bark terminology. *International Association of Wood Anatomist*. 15, 3-45.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., y Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Chumsri, P., Hiraga, Y., Yamasaki, K. (2001). Canthin-6-ona and  $\beta$ -carboline alkaloids from *Eurycoma harmadiana*. *Phytochemistry* 56, 383-386.
- Kim, H.S., Shibata, Y., Ko, N., Ikemoto, N., Ishizuka, Y., Murakami, N., y Wataya, Y. (2000). Potent *in vivo* antimalarial activity of 3, 15-di-O-acetylbruceolide against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Parasitology International*, 48 (3), 271-274.
- Kim, I.H., Suzuki, R., Hitotsuyanagi, Y. y Takeya, K. (2003). Three novel quassinoids, javanicolides A and B, and javanicoside A, from seeds of *Brucea javanica*. *Tetrahedron*, 59 (50), 9985-9989.
- Kim, H.P, Son K.H, Chang H.W, Kang S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Science*, 96, 229-245.
- Koike, K., y Ohmoto, T. (1990). Quassinoids from *Picrasma javanica*. *Phytochemistry*, 29 (8), 2617-2621.
- Kolodziej, H. y Kiderlen, A.F. (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*, 66 (17), 2056-2071.

- Kostman, T.A., y Franceschi, V.R. (2000). Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma*, 214 (3-4), 166-179.
- Kowarik, I. y Säumel, I. (2007). Biological flora of Central Europe: *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8 (4), 207-237.
- Kribs, D.A. (1935). Salientlines of structural specialization in the wood rays of dicotyledons. *Bot. Gaz.*, 96, 547-557.
- Kubo, I., Murai, Y. y Chaudhuri, S.K. (1992). Structure of chaparramarin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry*, 31 (9), 3262-3264.
- Kubo, I., Murai, Y., y Chaudhuri, S.K. (1993). Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry*, 33 (2), 461-463.
- Kunwar, R. M. y Bussmann, R. W. (2008). Ethnobotany in the Nepal Himalaya. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 4, 24.
- Kupchan, S.M., Britton, R.W., Lacadie, J.A., Ziegler, M.F., y Sigel, C.W. (1975). Tumor inhibitors. 100. Isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *The Journal of Organic Chemistry*, 40 (5), 648-654.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de La Lastra, C., Motilva, V., y Martín Calero, M. J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (1), 45-53.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27 (4), 969-978.
- Latif, Z., Craven, L., Hartley, T.G., Kemp, B.R., Potter, J., Rice, M.J., y Waterman, P.G. (2000). An insecticidal quassinoid from the new Australian species *Quassia* sp. aff. *bidwillii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (2), 183-184.
- León, H. (2001). Anatomía del leño, aspectos ecológicos y filogenia en mangles de Venezuela. *Revista Forest. Venez.*, 45, 191-203.
- León, H. (2005). Anatomía ecológica del xilema secundario de un bosque seco tropical de Venezuela/Ecological anatomy of secondary xylem in a tropical dry forest of Venezuela. *Acta Botánica Venezolánica*, 257-273.
- Leonti, M., Cabras, S., Weckerle, C.S., Solinas, M.N., y Casu, L. (2010). The causal dependence of present plant knowledge on herbals—contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (2), 379-391.
- Leskinen, V., Polonsky, J., y Bhatnagar, S. (1984). Antifeedant activity of quassinoids. *Journal of Chemical Ecology*, 10 (10), 1497-1507.
- Lewis, W.H. y Elvin-Lewis, P.F. (1977). Medical Botany Plants Affecting Man's Health. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto. 515 p.

- Lindorf, H. (1994). Eco-anatomical wood features of species from a very dry tropical forest. *IAWA Journal*, 15, 361-376.
- Lindorf, H. (1997). Wood and leaf anatomy in *Sessea corymbiflora* from an ecological perspective. *IAWA Journal*, 18, 157-168.
- Lock de Ugaz, O. (1994). Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos naturales. Ed. Fondo Editorial Pontificia Univ. Católica del Perú, pp113-118.
- Mabberley, D. J. (1997). The plant book: a portable dictionary of the vascular plants. *Cambridge*: Cambridge University Press. UK. pp. 155-158.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag Ed. Berlin, Heidelberg, New York, pp 76-136.
- Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A., y Salazar, R. (2000). Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection*, 19 (5), 301-305.
- Mareggiani, G y Pelicano, A. (2008). Zoología Agrícola. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp 254-267.
- Martínez, M.L., Campagna, M.N., Ratti, M.S., Nocito, I., Serra, E., Gattuso, S., y Gattuso, M.A. (2009). Trypanocide activity of *Castela coccinea* Griseb. extracts. *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 211-218.
- Martínez, M.L., Travaini, M.L., Rodríguez, M.V., Orellano, E., Nocito, I., Serra, E., Gattuso, M y Cortadi, A. (2013a). Tripanocide and antibacterial activity of *Alvaradoa subovata* Cronquist extracts. *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (3), 302-312.
- Martínez, M.L., Von Poser, G., Henriques, A., Gattuso, M., y Rossini, C. (2013b). Simaroubaceae and Picramniaceae as potential sources of botanical pesticides. *Industrial Crops and Products*, 44, 600-602.
- Martínez, N., (1992). Las plantas medicinales de México. Ed. Botas, México D.F., México. 655p.
- Martínez-Cayuela, M., (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77, 47-16.
- Martínez Crovetto, R. (1981). Las plantas utilizadas en medicina popular en el noroeste de Corrientes. *Fundación Miguel Lillo. Miscelánea* 69: 39-44.
- Metcalf, C.L., Flint, W.P., y Metcalf, R.L. (1951). *Destructive and Useful Insects*. 3<sup>era</sup> edición. Revised by RL Metcalf. McGraw-Hill Book Company.
- Metcalf, C, Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol. I Clarendon Press, Oxford, London, pp 317-326.
- Metcalf, C., Chalk, L. (1972). *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol I. Clarendon Press. Oxford London, pp 471-476.
- Metcalf, C. R., y Chalk, L. (1979). *Anatomy of the dicotyledons: Volume 1. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject*. Oxford, Clarendon Press.

- Middleton, Jr, E., Kandaswami, C., (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, pp 619-652.
- Moglia, J.G., y Giménez, A. (1998). Rasgos característicos del hidrosistema de las leñosas de la Región Chaqueña. *Revista de Investigaciones Agrarias-Sistemas y Recursos Forestales. España*, 7, 41-53.
- Moglia, J. y C. López. (2001). Estrategia adaptativa del leño de *Aspidosperma quebracho-blanco*. *Madera y Bosques*, 7(2), 13-25.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Montaño-Arias, S.A., Camargo-Ricalde, S.L., y Pérez-Olvera, C.D.L.P. (2013). Ecoanatomía de los elementos de vaso de la madera de cinco especies del género *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae). *Botanical Sciences*, 91(1), 1-10.
- Moretti, C., Deharo, E., Sauvain, M., Jardel, C., Timon David, P., y Gasquet, M. (1994). Antimalarial activity of cedronin. *Journal of Ethnopharmacology*, 43 (1), 57-61.
- Morton, J.F. (1990). Mucilaginous plants and their uses in medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 29(3), 245-266.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., y Lema, J.M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3890–3897.
- Moussalli, V. (1939). Contribution a l'etude des Simarubacees et, en particulier, des especes ayant une utilisation medicinale, alimentaire ou industrielle. *Trav. Lab. Mat. Med., Paris*, 29 (6), 1-210.
- Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., y Walker, L.A. (2004). A New Antimalarial Quassinoid from *Simaba orinocensis*. *Journal of Natural Products*, 67 (5), 772-777.
- Müller, R. (1908). Zur Anatomie der *Ailanthus*-Rinden. *Pharm. Praxis* 7: 261-263.
- Murray, R.D.H., Méndez, J., y Brown, S. A. (1982). The natural coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry. John Wiley & sons Ltd., New York. pp 235-236.
- Muschietti, L, Sülsen, V, y Martino V. (2013). Bioprospection of Potential Trypanocidal Drugs: A Scientific Literature Survey over the Period 2000–2010. *Studies in Natural Products Chemistry*, 39, 297-336.
- Nakata, P.A. (2002). Calcium oxalate crystal morphology. *Trends in Plant Science*, 7(7), 324.
- Nakata, P.A. (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, 164 (6), 901-909.
- Njar, V.C., Alao, T.O., Okogun, J.I., y Holland, H.L. (1993). 2-methoxycanthin-6-one: a new alkaloid from the stem wood of *Quassia amara*. *Planta Medica*, 59 (3), 259-261.



- Newman, D.J., Cragg, G.M., y Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66 (7), 1022-1037.
- Ninci, M.E. (1991). Prophylaxis and treatment of pediculosis with *Quassia amara*. *Rev. Fac. Cs. UNC*, 49 (2), 27-31.
- Norman, G.R., y Steiner, D.L. (1996). *Bioestadística*, Mosby-Doyma. Madrid. 250pp.
- Novello, C.R., Ferreira, A.G., Marques, L.C., y Cortez, D.A. (2003). Quassinoids from *Picrasma crenata*. *Natural Product Research*, 17(3), 145-148.
- Novello, C.R., Barbosa Bazotte, R., Bersani-Amado, C.A., Marques, L.C. y Cortez, D.A.G. (2008). Toxicological and Pharmacological Studies of *Picrasma crenata* (Vell.) Engler (Simaroubaceae) in Mice and Rats. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (3), 345-8.
- O'Brien, T., Mc Cully, M. (1981). The study of plant structure, principles and selected methods. Termarcaphi Pty. Ltd., Melbourne, Australia, p: 321.
- Ocampo, R., (1995). Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. CATIE, informe técnico N° 267, Turrialba, Costa Rica, 185p.
- Ocampo, R., y Maffioli, A. (1987). El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. Vol. 1. *Litografía e Imprenta LIL, SA, San José*, Costa Rica, 185p
- Ocampo, R y Mora, G. (2010). Las Plantas Medicinales de América Latina como Materia Prima ¿Cuál es, o debería ser su papel? *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (5), 323–325
- O'Donell, C. A. (1937). Anatomía comparada del leño de tres Simarubáceas argentinas. *Lilloa*, 1, 263-82.
- Oever van den, L., Baas, P y Zandee M. (1981). Comparative wood anatomy of *Symplocos* and latitude and altitude of provenance. *IAWA Bull.* 2, 3-24.
- Okano, M., Fukamiya, N., Aratani, T., Juichi, M., y Lee, K. H. (1985). Antitumor agents, Bruceanol-A and-B, two new antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *Journal of Natural Products*, 48 (6), 972-975.
- Okano, M., Fukamiya, N., y Lee, K. H. (2000). Bioactive quassinoids. *Studies in natural Products Chemistry*, 23, 285-333.
- Oketch-Rabah, H.A., Mwangi, J.W., Lisgarten, J., y Mberu, E.K. (2000). A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiática* roots. *Fitoterapia*, 71(6), 636-640.
- Oliveira, F., G. Akisue, y M. Akisue. (2005). Farmacognosia. Editora Atheneu. Sao Paulo, Brasil.
- OMS, O. (2002). Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. *Ginebra* 2002, 66. Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHOEDMTRM2002.1spa.pdf>
- OMS. (2012). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Nota descriptiva N°340 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.

- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Peters, W., y Suffness, M. (1986). Plants as sources of antimalarial drugs: *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(1), 101-104.
- Park, I.K., Lee, S.G., Choi, D.H., Park, J.D. y Ahn, Y.J. (2003). Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 39 (4), 375-384.
- Piazza, A., Barbado, J.L. (2005). Insumos permitidos en la producción orgánica. Fitosanitarios y abonos, Tomo I. Dunken Ed., Buenos Aires, Argentina. 296 p.
- Phillipson, J.D., (1999a). New drugs from nature. *Phytotherapy Research* 13, 2-8.
- Phillipson, J.D., (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56, 237-243.
- Philogène, B.J.R., Regnault-Roger, C. y Vincent, C. (2005). Botanicals: yesterday's and today's promises. *Biopesticides of plant origin*, 1-15.
- Pirani, J. (1987). *Simaroubaceae. Flora de Paraguay*. Ed. Missouri Botanical Garden. Sant Louis, Estados Unidos, pp: 7-28.
- Pohle, P., y Reinhardt, S. (2004). Indigenous knowledge of plants and their utilization among the Shuar of the lower tropical mountain forest in southern Ecuador. *Lyonia*, 7(2), 133-149.
- Polonsky, J. (1973). Quassinoid bitter principles. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*. Springer Vienna. pp. 101-150.
- Polonsky, J., Varon, Z., Moretti, C., Pettit, G.R., Herald, C.L., Rideout, J.A., y Khastgir, H.N. (1980). The Antineoplastic Quassinoids of *Simaba cuspidata* Spruce and *Ailanthus grandis* Prian. *Journal of Natural Products*, 43 (4), 503-509.
- Polonsky, J. (1985). Quassinoid bitter principles II. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, Vienna. pp. 221-264.
- Polonsky, J., Bhatnagar, S.C., Griffiths, D.C., Pickett, J. A., y Woodcock, C.M. (1989). Activity of quassinoids as antifeedants against aphids. *Journal of chemical ecology*, 15(3), 993-998.
- Popinigis, I., Moreira, E.A., Nakashima, T., Krambeck, R., y Miguel, O.G. (1980). Pharmacognostic study of *Picramnia parvifolia* Engler. Simaroubaceae. *Trib. Farm*, 48, 24-43.
- Prakash, A., Rigelhof, F., y Miller, E. (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19 (2), 1-4.
- Prior, R.L., Cao, G., Prior, R.L., Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International*. 83, 950–956.

- Rabossi, A., Boccaccio, G.L., Wappner, P., Quesada-Allue, L. (1991). Morphogenesis and cuticular markers during the larval-pupal transformation of the medfly *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 60, 135-140.
- Readel K., Seigler D, Young D., (2003). 5-methoxycanthin-6-ona from *Leitneria floridana* (Simaroubaceae). *Biochem. Systematics and Ecology*, 31, 176-170.
- Repetto, M.G., y Llesuy, S.F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35 (5), 523-534.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., y Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22 (4), 375-383.
- Rivero-Cruz, J.F., Lezutekong, R., Lobo-Echeverri, T., Ito, A., Mi, Q., Chai, H. B., y Kinghorn, A. D. (2005). Cytotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glauca* collected from a plot in Southern Florida. *Phytotherapy Research*, 19(2), 136-140.
- Robak J, Gryglewski R. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37 (5) 837-841.
- Rodríguez, S.M., M.I. Moreira, R.A. Giménez, S. Russo, A.M. Márquez, R.A. Ricco, A.A.Gurni, y M.L. Wagner. (2008). Acción Insecticida de Extractos de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. (Simaroubaceae) en el Gorgojo del Arroz, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae). *Dominguezia* 24(2), 95–101.
- Rodríguez, S., Regonata, M., Carrizo, P., Meilána, J., Wagner, M. y Gurni, A. (2011). Activity of nonpolar extracts from *Picrasma crenata* (simaroubaceae) against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididadae). *Rev. Latinoamer. Quím.* 39-43.
- Roldán, R.M., Noriega, M.F., Wagner, M.L., Gurni, A.A. y Bassols G.B. (2007). Estudio de Genotoxicidad de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.-Simaroubaceae. *Acta Toxicol. Argent.* 15(2), 39–42.
- Roth, I. (1981). *Structural patterns of tropical barks*. *Encyclopedia of Plant Anatomy Vol. IX, Part 3* (3): 609. E. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart.
- Roth, I. (1984). *Stratification of tropical forests as seen in leaf structure*. Dr W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands. 136p
- Roth, I. (1990). *Leaf structure of a Venezuelan cloud forest in relation to the microclimate*. Vol. 14, G. Borntraeger Ed., Berlin.
- Roth, I. (1992). *Leaf structure: coastal vegetation and mangroves of Venezuela*. *Handbuch der Pflanzenanatomie: Spezielle Teil*, Vol. 14 (2), Gebruder Borntrager Ed., Berlin.
- Salisbury, E. (1927). On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland Flora. *Phil trans. R. Soc. London*, Ser. B 216: 1-65.

- Salunke, B.K., Kotkar, H.M., Mendki, P.S., Upasani, S.M., y Maheshwari, V.L. (2005). Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection*, 24(10), 888-893.
- Sanchez E. y Comin J. (1971). Two new  $\beta$ -carboline alkaloids from *Aeschrion crenata*. *Phytochemistry*, 10, 2155-2159.
- Sasaki M, Joh T. (2007). Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40, 1–12.
- Schlichting, C.D., y Smith, H. (2002). Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology*, 16 (3), 189-211.
- Scholz, H. (1964). Sapindales. In 'Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. 12<sup>th</sup> Edn., Vol. 2, Ed. H. Melchior. Gebrüder Bornträger, Berlín. pp: 267-268.
- SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2004). Programa Nacional de Control y Erradicacion de la Mosca de los Frutos. Disponible en: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar)
- Shi, H.Y., Zhou, Y.F., Guo, J.S., y Liu, W.Z. (2011). Development and Cytochemistry of Secretory Ducts in *Ailanthus altissima*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 7, 002.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in ciclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chemistry*, 40 (6), 945-948.
- Simão, S., Barreiros, E., Da Silva, M., y Gottlier, O. (1991). Chemogeographical evaluation of quassinoids in Simaroubaceae. *Phytochemistry* 30, 853-865.
- Sleumer, H. (1953). Notas sobre la Flora Argentina II. Las Simaroubaceae Argentinas. *Lilloa*, 26, 162-172.
- Soine, T.O. (1964). Naturally occurring coumarins and related physiological activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, (3), 231–264.
- Solereder, H.O. (1908). *Systematic anatomy of the Dicotyledons, I*. Clarendon Press, London, pp. 857-859.
- Solis, P.N., Gutierrez Ravelo, A., Gonzalez, A.G., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. (1994). Bioactive anthraquinone glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. *fessionia*. *Phytochemistry*, 38, 477 - 480.
- Soong, Y.Y., y Barlow, P.J. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97(3), 524-530.
- Soto de Villatoro, B., Giral Gonzalez, F., Polonsky, J., Baskevitch-Varon, Z. (1974). Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from *Alvaradoa amorphoides*. *Phytochemistry*, 13, 2018–2019.
- Spencer, C.F., Koniuszy, F.R., Rogers, E.F., Shavel Jr,J., Easton, N.R., Kaczka, E.A. y Seeler, A.O. (1947). Survey of plants for antimalarial activity. *Lloydia*, 10 (3), 145-174.

- Stace, C.A. (1965). Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.* 4(1), 3-78.
- Starr, A.M. (1912). Comparative anatomy of dune plants. *Botanical gazette*, 54 (4), 265-305.
- Strittmatter, C. (1973). Nueva técnica de diafanización. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15 (1), 126-129.
- Strittmatter, C. (1979). Modificación de una técnica de coloración Safranina-Fast green. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 18 (3-4), 121-122.
- Strittmatter, C. (1980). Coloración con Violeta de Cresyl. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 19 (12), 273-276.
- Sülsen, V.P., Cazorla, S.I., Frank, F.M., Redko, F.C., Anesini, C.A., Coussio, J.D. y Muschietti, L.V. (2007). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 654-659.
- Susurluk, H., Çalışkan, Z., Gürkan, O., Kırmızıgül, S., y Gören, N. (2007). Antifeedant activity of some *Tanacetum* species and bioassay guided isolation of the secondary metabolites of *Tanacetum cadmeum* ssp. *cadmeum* (Compositae). *Industrial Crops and Products*, 26 (2), 220-228.
- Takhtajan, A. (1973). Evolution und Ausbreitung der Blütenpflanzen. (G. Fisher: Jena).
- Takhtajan, A. (1987). Systema Magnoliophytorum. Soviet Sciences Press, Leningrado.
- Tamura, S., Fukamiya, N., Okano, M., Koyama, J., Koike, K., Tokuda, H., Nishino, H. (2003). Three new quassinoids, ailantinol E, F, and G, from *Ailanthus altissima*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(4), 385-389.
- Terán, H.R. (1977). Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Trypetidae). *Revista Agronomica del Noroeste Argentino*, 14, 17-34.
- Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., Lacroix, M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*, 98, 490-501.
- Thomas, W.W. (1990a). The American genera of Simaroubaceae and their distribution. *Acta Bot. Bras.*, 4 (1), 11-17.
- Timmerman, H.A. (1927). Stomatal numbers. *Pharm. J. Ser.* 4, 735-42.
- Toursarkissian, M. (1980). Plantas medicinales de la Argentina. Editorial Hemisferio Sur, SA. Buenos Aires, Argentina.
- Trager, W., y Polonsky, J. (1981). Antimalarial activity of quassinoids against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(3), 531.
- Trockenbrodt, M. (1990). Survey and discussion on the terminology used in bark anatomy. *International Association of Wood Anatomists Bull.*, New series, 11, 141-166.



- Trockenbrodt, M. (1994). Quantitative changes of some anatomical characters during bark development in *Quercus robur*, *Ulmus glabra*, *Populus tremula* and *Betula pendula*. *IAWA Journal*, 15 (4), 387-398.
- Üphof, J.C., Hummel, K., Staesche, K. (1962). *Plant hairs*. In K. Linsbauer (ed.), *Hnadbuch der Pflanzenanatomie* 4(5): 1-292. Gebrüder Borntraeger, Berlín.
- Upton, R., Graff, A., Jolliffe, G., Länger, R., y Williamson, E. (2011). *American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines*. CRC Press Inc.
- Vanhaelen-Fastré, R., Luyengi, L., Vanhaelen, M., Declercq, J. P., y Van Meerssche, M. (1986). Two quassinoids and two coumarinolignoids from *Hannoa klaineana* roots. *Phytochemistry*, 26(1), 317-319.
- Van Steveninck, R.F.M., y Van Steveninck, M.E. (1991). Microanalysis. *Electron microscopy of plant cells*, 415-455.
- Varga, K., Szendrei, J., Reisch y Maroti, G. (1980). Indole Alkaloids of *Ailanthus altissima*. *Planta medica*, 40, 337-339.
- Verpoorte, R. (2007). Bioprospecting: exploring our only renewable natural resource. *Bol. Lat. y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5), 160.
- Villagra, P. y Roig, F. (1997). Wood structure of *Prosopis alpataco* y *P. argentina* growing under different edaphic conditions. *IAWA Journal*, 18, 37-51.
- Vigneron, M., Deparis, X., Deharo, E., y Bourdy, G. (2005). Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 351-360.
- Virgili, F., Scaccini, C., Packer, L., Rimbach, G. (2001). Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 87-99.
- Wagner, H., Blatt, S. (2001). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second Edition. Ed. Springer, Berlin.
- Watanabe, I., Koike, K., Satou, T., y Nikaido, T. (2000). Nematocidal activity of quassinoids against a species of Diplogastridae. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 23(6), 723-726.
- Webber, I. E. (1936). Systematic anatomy of the woods of the Simaroubaceae. *Amer. J. Bot.*, 23, 577-587.
- Wenzel U., Kuntz S, Brendel M.D, Daniel H. (2000). Dietary flavones is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60, 3823-3831.
- Wheeler, E.A., Pearson, R.G., La Pasha, C.A., Zack, T., Hatley, W. (1986). Computer-Aided Wood Identification. *N. Carolina Agricult. Res. Service Bull.* 474.
- Wheeler, E.A., Bass, P., Gasson, P.E. (1989). IAWA list of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bull.* 10, 219-332.

Woodcock, D. W. (1989). Distribution of vessel diameter in ring-porous trees. *Aliso*, 12, 287-93.

Xifreda, C.C., y Sanso, A. M. (1998). Taxonomical and nomenclatural report on woody argentinian flora: *Alvaradoa subovata* (Simaroubaceae) and *Roupala brasiliensis* (Proteaceae). *Darwiniana*, 35.

Xifreda, C, Seo, M. (2006). 138. Simaroubaceae. *Flora Fanerogámica Argentina*, Fascículo 99, Proflora-CONICET. 1-13.

Yoshimura, S., Sakaki, T., Ishibashi, M., Tsuyuki, T., Takahashi, T. y Honda, T. (1985). Constituents of seeds of *Brucea javanica*. Structures of new bitter principles, yadanziolides A, B, C, yadanziosides F, I, J, and L. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 58, 2673-2679.

Zhang, S.,P. Baas, y Zandee, M. (1992). Wood structure of the Rosaceae in relation to ecology, habit and phenology. *IAWA Bull.* 13, 307-349.

Zorning, H., Weiss, G. (1925). Anatomy of leaves of Compositae. *Arch. Pharm. Berl.* 263, 451-70.

Zuloaga, F.O., Morrone, O. y Rodríguez, D. (1999). Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*, 27 (1), 17-167.

Zuloaga, F.O., Morrone, O. y Belgrano, M.J. (2008). *Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay). Volume 2: Dicotyledoneae: Acanthaceae-Fabaceae*. Missouri Botanical Garden Press.